

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



*Análise de QTL com estudo de genes candidatos para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol usando um modelo genético composto pelas linhagens de ratos Lewis e SHR*

**Geison de Souza Izídio**

Florianópolis, Março de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Análise de QTL com estudo de genes  
candidatos para comportamentos  
relacionados à emocionalidade e ao  
consumo de etanol usando um modelo  
genético composto pelas linhagens de  
ratos Lewis e SHR**

**Geison de Souza Izídio**

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor ao Curso de  
Pós-graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina.

**Orientador:**

**Prof. Dr. André de Ávila Ramos**

Florianópolis, Março de 2009.

“Os ideais são como as estrelas, você não conseguirá tocá-las com suas mãos.  
Mas como os marinheiros nas águas desertas, elas podem guiá-lo, e, seguindo as  
estrelas, você chegará ao seu destino”.

Carl Sagan (1934-1996)

“À minha família, especialmente a minha primeira sobrinha Giulia de Souza Izídio do Prado”.

*In memoriam* de Arildo e Mário Alves de Souza.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria aqui de registrar meus mais sinceros agradecimentos a algumas pessoas que possibilitaram a conclusão de mais esta etapa da minha vida. De antemão, peço desculpas aos possíveis esquecidos desta lista.

- Ao meu grande orientador e amigo prof. André de Ávila Ramos. Agradeço por ele ter aberto a porta de seu laboratório para mim 9 anos atrás. Desde então, aprendi que ser doutor é muito mais do que escrever este manuscrito ou cursar disciplinas em um programa de pós-graduação. Ser doutor é saber pensar e raciocinar em todos os momentos da vida; é saber ensinar e passar conhecimento para o mais humilde ou para mais pretensioso e, também, aprender com eles. Espero um dia ter a chance de igualá-lo em sabedoria para provar que ele foi um grande mestre.
- As minhas parceiras do dia a dia no laboratório e colegas de pós-graduação Elayne e Thaíze. Saibam que sem vocês o caminho seria muito mais árduo. Tenho certeza que levaremos esta amizade pro resto de nossas vidas.
- As “minhas” queridas alunas de iniciação científica Lígia Fhurmann Gonçalves de Oliveira e Letícia Costa de Oliveira. Em uma profissão onde provavelmente estaremos de volta algum dia a docência, vocês me proporcionaram uma grande alegria, aprender a ensinar. Não posso descrever como foi recompensador ver o brilho do conhecimento despertando em vocês. A motivação final para concluir este trabalho, com certeza, se deve muito a vocês.
- Aos atuais colegas de laboratório Gabriela, Gustavo e Jonatas, pela amizade e

os bons momentos juntos. A grande ajuda nas tarefas diárias, especialmente na manutenção dos animais e laboratório, não será esquecida.

- As antigas colegas de laboratório, Ana Paula, Fabrícia, Francine, Janaína, Mariana, Natália, Thaís, que hoje seguem seus caminhos em outros laboratórios ou áreas de trabalho. Obrigado pela ajuda na realização deste trabalho e os bons momentos de convivência.
- A Dra. Silvana Chiavegatto, que não poupou esforços para fazer nossa colaboração científica render resultados excelentes. A oportunidade de conhecer outro laboratório, sem dúvida, me fez crescer muito. Com certeza, levarei comigo na carreira científica as coisas boas que aprendi com você.
- Ao Dr. Leandro Vendruscolo, que além da grande amizade, contribuiu muito na minha formação pessoal e científica ao longo de todo este doutorado.
- A Dra. Ilíada Rainha de Souza, que tantas vezes cedeu espaços em seu laboratório ou ensinamentos nos passou, demonstrando que a interação entre laboratórios pode elevar muito o nível da pesquisa que realizamos.
- A minha namorada Carolina, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, de alegrias ou de dificuldades. A ajuda em alguns procedimentos ou nos momentos de redação tornou-a uma pessoa igualmente importante na realização deste trabalho. Agradeço, também, a toda a sua família por me acolher e me apoiar em todos estes anos.
- Obrigado aos meus pais Nilson e Elisete. Seus atos conscientes e inconscientes me tornaram um cientista. Nunca irei esquecer daquele pesado livro sobre alguns mistérios da humanidade na prateleira onde eu não podia alcançar. Nascia ali, mais um homem da ciência.

- A toda minha grande família, especialmente, aos meus irmãos Juliana, Gustavo e Tatiana, as minhas avós Bárbara e Olinda, e meu cunhado Rogério, por todo o apoio e torcida para que tudo desse certo.
- A todos os meus amigos e amigas do Programa de Pós-graduação em Farmacologia.
- Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, que trabalham em favor de uma universidade pública, gratuita e de qualidade. Em especial aos professores Antônio de Pádua Carobrez e Reinaldo Naoto Takahashi, que acompanharam toda minha trajetória na ciência desde minha banca de conclusão de graduação até a banca de doutorado. Seus conselhos foram muito valiosos ao longo deste período.
- Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC. Em especial a Diana, que sempre prestativa me auxiliou ao longo de todos estes anos nas questões burocráticas.
- Aos professores Drs. Ana Lúcia Brunialti Godard, Antônio de Pádua Carobrez, Mário Pedrazzoli Neto, Reinaldo Naoto Takahashi, Silvana Chiavegatto e Thereza Christina Monteiro de Lima, por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho e contribuir com melhorias para com o mesmo.
- Ao meu grande amigo Bruno Rodrigo Gonçalves, que tanto me ensinou nesta vida e que hoje não se faz mais presente.
- Ao apoio financeiro do CNPq, sem o qual esta etapa não teria sido completada.

## RESUMO

IZÍDIO, Geison Souza **Análise de QTL com estudo de genes candidatos para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol usando um modelo genético composto pelas linhagens de ratos Lewis e SHR.** Florianópolis, 2009. 1p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: André de Ávila Ramos

Os ratos das linhagens isogênicas Lewis (LEW) e *spontaneously hypertensive rats* (SHR) diferem em uma série de aspectos comportamentais, incluindo a emocionalidade e o consumo de etanol. Um estudo prévio de QTL (locus para características quantitativas) identificou, em sub-linhagens LEW e SHR francesas, uma região genômica (*Ofil1*) fortemente associada à locomoção central no campo aberto (CA). Deste modo, neste estudo, utilizando sub-linhagens LEW e SHR brasileiras, nós realizamos uma primeira análise de QTL para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol seguida de uma segunda análise, somente em fêmeas, para comportamentos relacionados à ansiedade, considerando as fases do ciclo estral. Além disso, nós utilizamos a abordagem de genes candidato para avaliar o potencial envolvimento de dois genes (*Snca* e *Tac1r*) com o QTL *Ofil1*. Os resultados mostraram que *Ofil1* está presente nos machos das sub-linhagens LEW e SHR brasileiras. Além dele, foram encontrados quatro outros QTL significativos e seis sugestivos, influenciando comportamentos relacionados à ansiedade nos testes do CA e da caixa branca/preta (CBP) e o consumo de etanol. Em fêmeas, foram encontrados 10 QTL sugestivos e nenhum

significativo. A segunda análise de QTL demonstrou que as fases do ciclo estral parecem influenciar a expressão de *Ofil1*, pois somente as fêmeas em diestro-proestro apresentaram efeito sugestivo de *Ofil1*. Além disso, a análise por ciclo revelou dois QTL significativos nas fêmeas em diestro-proestro e um nas fêmeas em estro-metaestro. Na abordagem de genes candidatos, os animais LEW, mais “ansiosos”, tiveram maiores níveis de expressão do gene da  $\alpha$ -sinucleína (*Snca*), no hipocampo, quando comparados aos animais SHR. Um polimorfismo encontrado na posição +562 deste gene parece estar associado ao comportamento de aproximação do centro do CA. Por fim, o metilfenidato (MFD), uma droga que atua no sistema dopaminérgico, aumentou a esquiva de ambas as linhagens do centro do CA, sugerindo que mecanismos dopaminérgicos estão envolvidos neste comportamento. Estes resultados confirmam a presença de *Ofil1* nas sub-linhagens LEW e SHR brasileiras, sugerindo que ele não apresenta um efeito pleiotrópico sobre a emocionalidade e o consumo de etanol. A expressão deste QTL parece ser condicionada por fatores ligados ao ciclo estral em fêmeas. Diversos outros QTL foram encontrados ao longo do cromossomo 4 para comportamentos do CA, CBP e consumo de etanol, confirmando a importância deste cromossomo na busca de genes relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol. O gene da  $\alpha$ -sinucleína parece estar envolvido na regulação do comportamento de esquiva do centro do CA. O experimento farmacológico com o MFD sugere que a baixa ativação dopaminérgica pode diminuir a locomoção central, corroborando o papel da  $\alpha$ -sinucleína neste comportamento.

## ABSTRACT

**IZÍDIO, Geison Souza. QTL analysis and candidate genes approach to emotionality and alcoholism-related behaviors using a genetic model of rats, Lewis and SHR strains.**

Several studies show significant comorbidity between anxiety, depression and ethanol abuse, in both pre-clinical and clinical studies, although the neurobiological basis of this process remains uncertain. The influence of genetic factors is commonly demonstrated for these behavioral traits. The inbred rat strains Lewis (LEW) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) are known to differ for several anxiety, depression and alcoholism-related behaviors, one of which (inner locomotion in the open-field, OF) is strongly influenced by a locus on rat chromosome 4 (named *Ofil1*). Thus, in this study, we aimed to identify quantitative trait loci (QTL) on this same chromosome influencing different behaviors related to the aforementioned human psychopathologies. Moreover, a second QTL analysis was performed only with females considering their estrous cycle. Besides that, we have investigated potential molecular and physiological links between two genes localized in the *Ofil1* region, *Snca* ( $\alpha$ -synuclein) and *Tac1r* (NK1 receptor), and the behavioral differences observed between LEW and SHR rats. The QTL analysis revealed five significant loci on chromosome 4 in males. There were no significant loci in females, but 10 loci reached suggestive threshold. The second QTL analysis revealed that *Ofil1* expression may be dependent on factors such as estrous cycle in females. LEW rats were more fearful than SHR's and also consumed higher quantities of alcohol than SHR rats.  $\alpha$ -synuclein mRNA and protein concentrations were higher in the hippocampus, but not in the hypothalamus, of LEW rats. A novel

single nucleotide polymorphism identified in the  $\alpha$ -synuclein gene between these two rat strains was correlated with central locomotion in the OF, suggesting that this nucleotide exchange might participate in the differential expression of  $\alpha$ -synuclein between LEW and SHR rats. Finally, methylphenidate elicited a decrease in the approach towards the center of the OF, suggesting that this behavior is regulated, at least in part, by dopaminergic mechanisms.

## LISTA DE ABREVIACES

ACP = análise de componentes principais.

ACTH = hormônio adrenocorticotrfico (adrenocorticotropic hormone).

ANOVA = análise de variância.

AVP = vasopressina (arginine vasopressin).

CA = campo aberto.

CBP = caixa branca/preta.

cDNA = DNA complementar.

cM = centimorgan.

CRF = hormônio de liberação de corticotrofinas (corticotrophin realeasing factor).

DNA = cido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid).

DSM-IV = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

ENU = Etil-Nitroso-Uréia (N-ethyl-N-nitrosourea).

F344 = Fischer.

GABA = cido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$  amino butyric acid).

HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal.

i.p = intraperitonal.

LGC = Laboratório de genética do comportamento.

LCE = labirinto em cruz elevado.

LEW = Lewis.

LRS = Índice de verossimilhança estatística (likelihood ratio statistic).

M = molar.

MFD = metilfenidato.

mM = milimolar.

NAOH = hidróxido de sódio.

NMDA = N-metil-D-aspartato.

NPY = Neuropeptídeo Y

NR2b = subunidade 2b do receptor NMDA (N-methyl D-aspartate 2).

Ofil1 = locomoção central no campo aberto 1 (open field inner locomotion 1).

RGD = base de dados do genoma do rato (rat genome database).

RNA = ácido ribonucléico (Ribonucleic acid).

RNAm = RNA mensageiro (messenger ribonucleic acid).

RT-PCR = Transcrição reversa-Reação em cadeia da polymerase (Reverse transcription-polymerase chain reaction).

SHR = ratos espontaneamente hipertensos (Spontaneously Hipertensive Rats).

SNC = sistema nervoso central.

SNP = polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polimorfism).

TBE = Tris-boro-EDTA.

TNF = teste do nado forçado.

$\mu\text{M}$  = micromolar

QTL = Loci para características quantitativas (Quantitative trait loci).

WKY = Wistar-Kyoto.

5-HT = 5-hidroxitriptamina.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Estimativa da homologia genética entre as linhagens SHR, WKY, LEW e F344 ao longo de todo o cromossomo 4.

**Figura 2** – Abordagens que foram realizadas neste trabalho com o intuito de avançar no conhecimento das bases biológicas de alguns transtornos psiquiátricos humanos.

**Figura 3** - O aparato comportamental do campo aberto que foi utilizado nos experimentos.

**Figura 4** - O aparato comportamental da caixa branca/preta que foi utilizado nos experimentos.

**Figura 5** - O Teste do nado forçado (visto de cima) que foi utilizado nos experimentos.

**Figura 6** - As caixas utilizadas nos experimentos de consumo espontâneo de etanol.

**Figura 7** - Genotipagem dos animais através de gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo.

**Figura 8** - O aparato comportamental do labirinto em cruz elevado que foi utilizado nos experimentos.

**Figura 9** - Médias e erros padrão dos comportamentos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos e fêmeas.

**Figura 10** - Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 14 marcadores utilizados em todos os animais da população F2 neste estudo.

**Figura 11** - QTL significativo encontrado para a locomoção central no CA na análise de ligação com os 97 machos F2 LEW/SHR (modelo livre).

**Figura 12** - Os outros quatro QTL significativos encontrados na análise de ligação com os 97 machos F2 LEW/SHR (modelo livre).

**Figura 13** - Os cinco QTL significativos encontrados na análise de ligação com os 97 machos F2 LEW/SHR (modelo livre) ao longo do cromossomo 4.

**Figura 14** - Os cinco QTL independentemente mapeados no cromossomo 4 do rato para: preferência por 10% de etanol nas linhagens P e NP; locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR; preferência por 5% de etanol nas linhagens HEP e WKY; níveis de corticosterona nas linhagens LEW e F344 e locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR no presente estudo.

**Figura 15** - Comportamento das fêmeas F2 no teste do CA e da CBP segundo as diferentes fases do ciclo estral.

**Figura 16** - Os dois QTL sugestivos encontrados para a locomoção central no CA na análise de ligação com as 43 fêmeas no Diestro-proestro ou com as 53 fêmeas no Estro-metaestro.

**Figura 17** - A análise de ligação realizada com todas as 192 fêmeas incluindo as diferentes fases do ciclo estral.

**Figura 18** - Locomoção central (a) e total (b) no campo aberto com animais LEW e SHR.

**Figura 19** – Quantidade de RNAm do gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína (a) e do gene *Tac1r* do receptor Nk1 (b) no hipocampo e hipotálamo dos ratos LEW e SHR.

**Figura 20** - Entradas nos braços (fechados e abertos) e porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE, locomoção em ambos os compartimentos (branco e preto) e porcentagem de tempo gasto no compartimento branco dos ratos LEW e SHR.

**Figura 21** - Consumo (g/kg/dia) e preferência de etanol oferecido como livre-escolha com água nas concentrações de 2, 4, 6 e 10% dos ratos LEW e SHR.

**Figura 22** - Locomoção central, locomoção periférica e defecação no CA dos genótipos possíveis nos ratos machos F2 no SNP encontrado na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína (CC, CT e TT).

**Figura 23** - Locomoção central e total no CA; tempo nos braços abertos e entradas nos braços fechados do LCE nos animais machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR tratados com salina ou metilfenidato.

**Figura 24** - Preferência por sacarina ou quinino nos animais machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR tratados com salina ou metilfenidato.

**Figura 25** - Ingestão de etanol 10%, em machos LEW e SHR tratados com salina ou metilfenidato, oferecido como livre-escolha com água.

**Figura 26** - Ingestão de etanol 10%, em fêmeas LEW e SHR tratadas com salina ou metilfenidato, oferecido como livre-escolha com água.

**Figura 27** - Os cinco primeiros cromossomos do rato e sua homologia com os cromossomos humanos e dos camundongos.

**Figura 28** - Regiões genômicas associadas com o fenótipo, na primeira análise de QTL.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - As seqüências nucleotídicas (5'-3') dos pares de *primers* (*forward* e *reverse*) para cada um dos 14 marcadores moleculares utilizados na genotipagem dos animais.

**Tabela 2** - Médias e erros padrão dos comportamentos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos e fêmeas.

**Tabela 3** - Herdabilidade ( $h^2$ ) de quatro traços fenotípicos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos e fêmeas.

**Tabela 4** - Matriz de correlação originada a partir da análise de 13 variáveis comportamentais nos testes do campo aberto, caixa branca/preta, nado forçado e consumo de etanol em machos.

**Tabela 5** - Matriz de correlação originada a partir da análise de 13 variáveis comportamentais nos testes do campo aberto, caixa branca/preta, nado forçado e consumo de etanol em fêmeas.

**Tabela 6** - Análise de componentes principais de 13 traços fenotípicos medidos nos 97 ratos machos da geração F2 LEW/SHR.

**Tabela 7** - Análise de componentes principais de 13 traços fenotípicos medidos nas 96 ratas fêmeas da geração F2 LEW/SHR.

**Tabela 8** - QTL significativos identificados nos ratos machos na primeira análise de QTL com os animais F2 LEW/SHR.

**Tabela 9** - QTL sugestivos identificados nos ratos (machos e fêmeas) na primeira análise de QTL realizada com os animais F2 LEW/SHR.

**Tabela 10** - QTL significativos e sugestivos identificados nas ratas fêmeas no diestro-proestro a partir da análise de ligação com os animais F2.

**Tabela 11** - QTL significativos e sugestivos identificados nas ratas fêmeas no estro-metaestro a partir da análise de ligação com os animais F2.

**ARTIGOS E RESUMOS INTERNACIONAIS ORIGINADOS POR ESTE TRABALHO:**

IZÍDIO, G. S.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, E.; WEHRMEISTER T. D.; RAMOS, A. QTL analysis to emotionality and alcoholism-related behaviors using Lewis and SHR rat strains. Em preparação.

CHIAVEGATTO, S.; IZÍDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T. A.; TORRÃO, A. S.; CONCEIÇÃO, I. M.; BRITTO, L. R. G.; RAMOS, A. Expression of  $\alpha$ -synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. *Molecular Psychiatry*, no prelo, 2009.

VENDRUSCOLO, L. F. \*; IZÍDIO, G. S. \*; TAKAHASHI, R. N.; RAMOS, A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Pharmacology*, v. 19, p. 21-27, 2008. \* Os autores contribuíram igualmente para a realização do trabalho.

IZÍDIO, G. S.; OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, E.; RAMOS, A. Identification of quantitative trait loci affecting emotionality-related behaviors in rats chromosome 4. *The international journal of neuropsychopharmacology*, v. 11, p. 273, 2008.

RAMOS, A.; IZÍDIO, G. S.; OLIVEIRA, F. B.; SILVA, F. M.; MELO, N. E. B.; COSTA, A. P. R. Genetic and factorial analysis of behaviors related to anxiety, depression and alcohol intake in an intercross between Lewis and SHR rats. 8

Annual Meeting of the international Behavioural and Neural Genetics Society,  
Vancouver - British Columbia, 2006.

CHIAVEGATTO, S.; IZÍDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T.  
A.; TORRAO, A. S.; RAMOS, A. Increased expression of alpha-synuclein in the  
hippocampus of anxious-like inbred rats. Neuroscience, Atlanta, 2006.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 Estresse .....	27
1.2 Ansiedade .....	28
1.3 Alcoolismo.....	30
1.4 Depressão.....	31
1.5 Comorbidades.....	33
1.6 O uso de roedores na pesquisa biomédica .....	35
1.7 Testes Comportamentais .....	37
1.8 Modelos Genéticos Animais .....	39
1.8.1 Linhagens Lewis e SHR .....	40
1.9 Estudos de QTL .....	43
1.10 Busca de genes candidatos .....	48
1.11 Hipóteses .....	50
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
2.1. Objetivo geral.....	52
2.2. Objetivos específicos.....	52
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
3.1 Animais .....	55
3.2 Produção dos animais F2 .....	55
3.3 Fenotipagem .....	57
3.3.1 Campo Aberto (CA) .....	57
3.3.2 Caixa Branca/Preta (CBP) .....	58
3.3.3 Teste do nado forçado (TNF) .....	60
3.3.4 Consumo espontâneo de etanol .....	61
3.4 Análise genética quantitativa .....	62
3.5 Matriz de correlação e ACP.....	62
3.6 Genotipagem .....	63

3.7 Géis de agarose e poliacrilamida .....	66
3.8 Primeira análise de QTL .....	67
3.9 Segunda análise de QTL .....	69
3.10 Indução do ciclo estral .....	69
3.11 Material biológico para análise de expressão gênica .....	70
3.12 Extração de RNAm .....	71
3.13 Preparação dos primers para Real time-PCR .....	71
3.14 Síntese de cDNA .....	72
3.15 Análise da expressão gênica .....	73
3.16 Análise de SNP .....	74
3.17 Testes farmacológicos .....	75
3.18 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	75
3.19 Protocolo de consumo em livre escolha .....	77
3.20 Estatística .....	77
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>80</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>128</b>
5.1 Primeira estratégia experimental .....	129
5.2 Segunda estratégia experimental .....	157
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>168</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>171</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>209</b>
8.1 Campo Aberto (CA) .....	209
8.2 Caixa Branca/Preta (CBP) .....	210
8.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	211
8.4 Teste do nado forçado (TNF) .....	211
8.5 Teste de consumo de etanol .....	212
8.6 Ciclo estral .....	213

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Estresse

Durante o século XIX, o francês Claude Bernard postulou que um dos aspectos mais característicos dos seres vivos seria a habilidade de manter a constância do seu meio interno apesar das modificações no ambiente ao seu redor. Posteriormente, Walter Bradford Cannon, um fisiologista norte americano, chamou esta capacidade de “homeostase”, do grego *homeo* (similar) e *stasis* (estático) (1929).

Em 1936, Hans Selye conceituou o termo estresse como sendo o conjunto de respostas orgânicas, psicológicas e/ou comportamentais de um organismo frente a um estímulo causador. Assim, o estresse seria causado por estímulos ambientais (estressores) que estariam pondo em risco a homeostase interna do organismo. As mudanças sofridas durante os eventos de estresse estariam principalmente relacionadas à atividade do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), envolvendo a ação de receptores glicocorticóides e mineralocorticóides, e teriam o objetivo de adaptar o indivíduo à nova situação gerada pelo estímulo estressante (Selye, 1976; Juruena *et al.*, 2004).

Mais recentemente, Sterling e Eyer (1988) sugeriram que, na verdade, a estabilidade do meio interno seria alcançada por meio da mudança e não da constância, propondo assim, o termo alostasia para definir este conceito. Em 2003, Goldstein sugere, então, que a alostasia tem por essência a regulação ao redor de um estado aparente alterado e que depende da ativação de processos de adaptação através de mediadores químicos, como catecolaminas, esteróides da adrenal e citocinas.

O interesse pelo estudo dos mecanismos biológicos relacionados ao estresse tem crescido à medida que são acumuladas evidências de seus efeitos prejudiciais sobre a saúde e o bem estar de seres humanos e animais (Kudielka *et al.*, 2004; Swaab *et al.*, 2005; Kajantie e Phillips, 2006; Luine *et al.*, 2007). Por exemplo, acredita-se hoje que os efeitos do estresse podem participar na indução de muitas patologias diferentes como: problemas cardiovasculares (Bunker *et al.*, 2003), doenças infecciosas (Sheridan *et al.*, 1998; Konstantinos e Sheridan, 2001) e transtornos psiquiátricos, como aqueles relacionados à ansiedade (Lanfumeey *et al.*, 2008), à depressão (Dranovsky e Hen, 2006) e ao alcoolismo (Heilig e Koob, 2007; Clarke *et al.*, 2008), sendo estes o foco do presente trabalho.

### *1.2 Ansiedade*

A ansiedade, segundo o dicionário, é definida como: “atitude emotiva concernente ao futuro; medo vago adquirido especialmente por generalização de estímulos” (Michaelis, 2009). Como tal, ela se enquadra na categoria das emoções que, possivelmente, já foram experimentadas por todos nós seres humanos diversas vezes durante a vida. Em termos biológicos, podemos defini-la como um conjunto de respostas fisiológicas (aumento da atividade do sistema nervoso autonômico, taquicardia, sudorese) e comportamentais (aumento na vigília e na reatividade comportamental; esquiva) aumentadas que, em conjunto, protegem um indivíduo diante de uma situação potencialmente perigosa (File *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2000; Adamec *et al.*, 2001; Belzung e Griebel, 2001; Blanchard *et al.*, 2001a, 2001b; Dielenberg e McGregor, 2001; File, 2001).

Alguns pesquisadores sugerem que a ansiedade pode ser dividida em duas categorias: “ansiedade estado” e “ansiedade traço”. Estas refletiriam,

respectivamente, as respostas de ansiedade aumentadas de um indivíduo em um momento particular, na presença de uma situação provocadora; e a ansiedade constante através do tempo, como uma característica permanente do indivíduo (Lister, 1990). Entretanto, estas respostas consideradas normais de cada indivíduo podem, na presença de fatores estressantes contínuos e de fatores de predisposição genética, desencadear os transtornos de ansiedade. Segundo o DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994), os transtornos de ansiedade compreendem: a ansiedade generalizada, a fobia social, as fobias específicas, o estresse pós-traumático, o transtorno de pânico e o transtorno obsessivo-compulsivo. Existe uma estimativa de que cerca de 17% dos brasileiros são afetados ao menos uma vez durante a vida por algum transtorno de ansiedade (WHO, 2000). Igualmente, nos Estados Unidos, 19 milhões de pessoas adultas são afetadas, sendo gastos mais de 42 bilhões de dólares por ano com tratamentos e prejuízos causados por estes transtornos (Greenberg *et al.*, 1999). Além destes números colocarem os transtornos de ansiedade entre as psicopatologias de maior incidência na população humana (Anagnostaras *et al.*, 1999), sabe-se que estes transtornos apresentam uma maior prevalência em mulheres do que em homens (Essau *et al.*, 2000; Bekker *et al.*, 2007).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se elucidar as bases neurobiológicas dos transtornos de ansiedade. Uma das teorias neuroanatômicas vigentes propõe um papel crucial da formação hipocampal nos comportamentos relacionados à ansiedade (Gray e McNaughton, 2000), sendo que evidências experimentais vêm demonstrando o papel desta estrutura cerebral nos comportamentos relacionados aos transtornos de ansiedade (Bannerman *et al.*, 2004; Kalisch *et al.*, 2006; Nascimento Häckl *et al.*, 2007). Da mesma maneira o eixo

HPA também vem sendo implicado na patogênese destes transtornos, tornando, assim, o hipotálamo uma área cerebral de grande interesse no campo de estudos da ansiedade (Leonardo e Hen, 2006).

### *1.3 Alcoolismo*

A palavra alcoolismo, segundo o dicionário, é definida como: “estado patológico, resultante da ingestão habitual ou acidental de bebidas alcoólicas” (Michaelis, 2007). Do ponto de vista científico, o alcoolismo é um tipo de abuso de drogas que envolve uma dependência física e psicológica pela droga psicotrópica etanol (Brady e Sonne, 1999; Ehlert *et al.*, 2001). Ele pode ser definido como um transtorno comportamental complexo, com fatores genéticos, psicossociais e ambientais influenciando seu desenvolvimento e manifestações (Cloninger, 1987; Rodd *et al.*, 2007). Sabe-se que o etanol atua no sistema nervoso central (SNC) como um depressor, através da facilitação da abertura dos canais de cloreto acoplados aos receptores GABA, resultando em um decréscimo de tensão e na inibição da ansiedade. Além disso, a exposição repetida ao álcool pode induzir alterações comportamentais como sedação, sensibilização ou tolerância (aumento ou diminuição, respectivamente, das respostas comportamentais produzidas pelo álcool) e sinais de abstinência (ex. aumento de ansiedade). Estas alterações têm sido consideradas fatores importantes para o desenvolvimento de dependência ao álcool (Koob e LeMoal, 1997; Darbra *et al.*, 2002).

Estima-se que, mundialmente, existam cerca de 2 bilhões de pessoas que consomem algum tipo de bebida alcoólica e mais de 76 milhões de pessoas com problemas relacionados ao uso abusivo dessa substância (WHO, 2004). Esta alta prevalência do abuso de álcool impõe uma perda financeira estimada em 185

bilhões de dólares anuais somente nos EUA (Li *et al.*, 2004), devido ao tratamento e a mortalidade dos dependentes e à redução de produtividade das empresas e indústrias.

Cloninger (1987) propôs uma classificação dos pacientes alcoolistas em dois subtipos: o tipo 1, caracterizado por traços de personalidade ansiosa e pelo rápido desenvolvimento de tolerância e dependência às propriedades ansiolíticas do álcool. Estes alcoolistas teriam início tardio no vício e pouca complicação social, apresentando, porém, maiores índices de ansiedade e depressão em comorbidade. Este tipo seria mais presente em mulheres do que em homens. Já o tipo 2, seria caracterizado por traços de personalidade anti-social e ingestão de álcool motivada por seus efeitos eufóricos. Estes dependentes apresentariam um tipo de personalidade que manifesta altos níveis de impulsividade, busca de novidade e reduzida capacidade para evitar riscos. O tipo 2, contrariamente ao tipo 1, seria mais presente em homens do que em mulheres (Cloninger, 1987). Apesar destes dados que sugerem uma distribuição diferenciada do alcoolismo entre os dois sexos, homens geralmente consomem mais álcool e tem uma maior prevalência de alcoolismo do que mulheres (Harford *et al.*, 1998; Dawson *et al.*, 2005). Assim, sugere-se que fatores ligados ao gênero são importantes na etiologia desta patologia complexa.

#### *1.4 Depressão*

Como definido pelo DSM-IV (1994), a depressão é um transtorno heterogêneo frequentemente manifestado com sintomas no nível psicológico, comportamental e fisiológico. Os seus sintomas poderiam ser agrupados em duas categorias: a) relativa à cognição, como, humor deprimido, culpa, desespero,

anedonia e b) relativa às funções somáticas, como a anorexia, insônia, retardo psicomotor e perda de peso, entre outros (Borsini e Meli, 1988). Além destes sintomas mencionados, há ainda o alto risco de tentativas de suicídio associadas aos pensamentos de morte, que podem culminar com o próprio ato, que se apresenta entre 15 e 30% dos casos de depressão maior (Graeff *et al.*, 1999). Atualmente, o transtorno afetivo da depressão constitui um importante problema de saúde pública. Calcula-se, que 13 a 20% da população brasileira apresentam algum sintoma depressivo em determinado momento da vida, e que 2 a 3% desta população encontra-se hospitalizada ou com as atividades diárias prejudicadas devido a esta doença afetiva (Graeff *et al.*, 1999; WHO, 2000). Do mesmo modo, alguns dados publicados sugerem que os índices de prevalência da depressão chegam a cerca de 16% na população adulta dos Estado Unidos, com um gasto estimado em 80 bilhões de dólares ao ano (Kessler *et al.*, 2003; Greenberg *et al.*, 2003).

No entanto, apesar da gravidade deste transtorno, algumas vezes ele é sub-diagnosticado e sub-tratado. Existe uma estimativa de que 50% a 60% dos casos de depressão não são detectados pelo médico clínico. Muitas vezes, os pacientes deprimidos também não recebem tratamentos suficientemente adequados e específicos (McQuaid *et al.*, 1999), o que contribui para a gravidade dos casos. Assim, como nos transtornos de ansiedade e alcoolismo, fatores sexuais parecem estar ligados ao desenvolvimento desta psicopatologia, pois se sabe que a maior incidência de transtornos depressivos ocorre em mulheres (Piccinelli e Wilkinson, 2000; Kalia, 2005).

Estudos no campo da psiquiatria sugerem que a atividade do eixo HPA apresenta grande importância na etiologia da depressão. Uma porcentagem

significante de pacientes têm mostrado concentrações aumentadas de cortisol (o glicocorticóide endógeno em humanos) no plasma, urina e fluído cérebro-espinhal; uma resposta de cortisol exagerada ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e um alargamento das glândulas pituitária e adrenal (Barden *et al.*, 1995; Nemeroff, 1996; Juruena *et al.*, 2004; Anisman *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2008). Além disso, alguns trabalhos sugerem que os antidepressivos exercem ao menos parte dos seus efeitos clínicos através da modulação de hormônios glicocorticóides (Holsboer, 2000). Ainda, alguns resultados têm fornecido evidências de que durante a depressão ocorre a disfunção de estruturas límbicas, incluindo o hipotálamo e o hipocampo, resultando em hipersecreção de CRF (fator de liberação da corticotrofina) e AVP (vasopressina), que induzem ativação da pituitária e adrenal (para revisão ver Juruena *et al.*, 2004).

### *1.5 Comorbidades*

Diversos estudos vêm demonstrando uma forte associação dos transtornos de ansiedade e depressão com o abuso de substâncias (Grant e Harford, 1995; Merikangas e Swendsen, 1997; Nurnberger *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2004; Quello *et al.*, 2005). Alguns têm enfatizado que o consumo de substâncias de abuso causa diretamente ansiedade, depressão, ou outros problemas mentais (Allan, 1995; Schuckit e Hesselbrock, 1996), enquanto que outros estudos têm demonstrado que são os transtornos psiquiátricos, como a ansiedade e a depressão, que podem levar à dependência de algumas substâncias, através de tentativas de auto-medicação (Cox *et al.*, 1993; Kushner *et al.*, 1994; 1996). Todavia, a maioria da literatura existente ressalta a heterogeneidade destas relações bem como a possibilidade de que influências em ambas as direções podem existir simultaneamente (Merikangas e

Gelernter, 1990; Merikangas *et al.*, 1996; Wittchen *et al.*, 1996; Kessler *et al.*, 1997; Swendsen e Merikangas, 1998). Em parte, a grande dificuldade de se encontrar um mecanismo simples de comorbidade é devida aos seus numerosos subtipos e, também, à heterogeneidade de cada uma das psicopatologias por si só. Isto, sem dúvida, contribui para a grande dificuldade de se encontrar as bases biológicas das comorbidades entre as diferentes psicopatologias.

Até o momento, diversos estudos foram realizados demonstrando que existem taxas variáveis, mas que normalmente indicam uma alta comorbidade entre ansiedade e depressão (Yerevanian *et al.*, 2001). Por exemplo, sabe-se que mais de 85% dos indivíduos depressivos experimentam sintomas significativos de ansiedade (Rihmer *et al.*, 2001). Por outro lado, a grande maioria das pessoas com o transtorno de ansiedade generalizada apresenta ao longo da vida ao menos algum outro transtorno, sendo os relacionados à depressão os mais recorrentes (Massion *et al.*, 1993; Wittchen *et al.*, 1994; Stein, 2001). Alguns pesquisadores até mesmo assumem que é difícil definir se ansiedade e depressão são um único transtorno misto ou dois transtornos diferentes eventualmente ocorrendo em comorbidade (Rouillon, 1999). Nos modelos animais, existem trabalhos sugerindo uma possível correlação entre os comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão (Hinojosa *et al.*, 2006), sugerindo que os mecanismos neurobiológicos reguladores destes comportamentos, ao menos em parte, podem ser comuns.

Diversos estudos também sugerem existir uma comorbidade clínica entre a ansiedade e o alcoolismo (Regier *et al.*, 1990; Schuckit, 1994; Greeley e Oei, 1999; Pandey, 2003; Pandey *et al.*, 2005). Por exemplo, existe uma hipótese de redução de tensão que prediz que indivíduos normalmente ansiosos ou estressados (em um estado sem droga), demonstram uma maior predisposição para consumirem etanol

(Conger, 1956; para revisão ver Cappell e Herman, 1972; Schuckit e Hesselbrock, 1994; Cornelius *et al.*, 2003). Enquanto alguns estudos clínicos apontam para esta possível correlação, existe alguma evidência de que o abuso crônico de etanol precede os transtornos de ansiedade e não o contrário (Allan, 1995). Em roedores, diversos experimentos foram realizados no intuito de se entender melhor esta possível relação entre estas duas patologias. Alguns deles têm demonstrado uma correlação positiva entre comportamentos relacionados à ansiedade e o consumo de etanol, sugerindo uma ligação genética entre eles (Colombo *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1995; Möller *et al.*, 1997), enquanto outros mostram resultados contraditórios (Tuominen *et al.*, 1990; Viglinskaya *et al.*, 1995; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Izídio e Ramos, 2007).

#### *1.6 O uso de roedores na pesquisa biomédica*

Os animais não humanos são de grande importância para a pesquisa biomédica. Dentre estes, os roedores assumem um papel de grande destaque, pois muitas das manipulações necessárias para a elucidação de mecanismos genéticos, bioquímicos ou fisiológicos envolvidos nas patologias são realizadas neles. Isto se deve ao fato de que os roedores são também mamíferos e apresentam diversas similaridades com os humanos como: plano de corpo, sistemas orgânicos e mecanismos de regulação psicológica (Tecott, 2003). Além disso, análises genômicas comparativas indicam que humanos e ratos/camundongos tiveram um ancestral comum há aproximadamente 75 milhões de anos atrás, o que sugere uma grande similaridade genética entre eles (Madsen *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2001).

Dentre os roedores, o camundongo (*Mus musculus*) é o animal modelo preferido pelos geneticistas, por razões práticas (custo mais baixo, facilidades de

armazenamento e de manipulação), históricas (maior conhecimento acumulado, sendo o primeiro roedor com o genoma totalmente seqüenciado) (Gregory *et al.*, 2002) e metodológicas (produção de animais *knock-out*). Porém, o rato (*Rattus norvegicus*), além de ser a espécie preferida na fisiologia e farmacologia, tem ganhado maior atenção nos últimos anos entre os geneticistas, pois teve, entre outras coisas, o seu genoma completamente seqüenciado (Nadeau, 1999; Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). Além disso, há um acúmulo de conhecimento considerável em diversas áreas, inclusive com a possibilidade, através de bancos de dados gênicos, de se comparar regiões cromossômicas do rato com as de humanos e camundongos.

O rato apresenta um genoma um pouco menor do que o dos humanos (2,75 bilhões de pares de bases e 21 cromossomos vs. 2,9 bilhões de pares de bases e 23 cromossomos; respectivamente) e um pouco maior do que o de camundongos (2,6 bilhões de pares de bases e 20 cromossomos). Entretanto, todas as três espécies apresentam cerca de 30 mil genes, sendo que 40% deles são muito próximos em estrutura e função (Rew, 2004). Além disso, existem cerca de 1000 doenças hereditárias humanas documentadas atualmente, onde a participação genética não é bem entendida, sendo que 75% delas têm genes análogos em ratos (Rew, 2004).

Apesar da ansiedade e da depressão serem fenômenos essencialmente humanos, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes têm sido descritas em diversas espécies animais. Estas respostas parecem ser parte de um mecanismo universal através do qual os organismos se adaptam a condições adversas (Gross e Hen, 2004). Neste mesmo sentido, a ingestão de etanol por ratos pode nos oferecer pistas acerca das bases biológicas do alcoolismo humano. Assim,

para que possamos desenvolver novos fármacos tão ou mais eficientes que os atuais para o tratamento da ansiedade, da depressão ou do alcoolismo, ou mesmo para que possamos aprender mais sobre a etiologia destes transtornos, torna-se grande a importância dos testes comportamentais com animais não-humanos. De fato, no campo de pesquisa psiquiátrica, existem diversos modelos de ratos e camundongos já validados (Broadhurst, 1975; Plomin *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1998; Liebsch *et al.*, 1998; Brush *et al.*, 1999; Landgraf e Wigger, 2003; Ramos *et al.*, 2003). Estes animais são testados em diversos aparatos que induzem comportamentos de algum modo relacionados aos transtornos humanos. Além disso, recentemente, algumas metodologias de animais *knock-out* (Vicini e Ortinski, 2004), *knock-in* (Dawson *et al.*, 2005), transgênicos (George *et al.*, 2008), linhagens recombinantes (Printz *et al.*, 2003) e mutados através de ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) (Hoyne e Goodnow, 2006) têm contribuído na investigação de genes importantes para funções cerebrais e transtornos mentais humanos. Como milhares de genes foram identificados com o sequenciamento do genoma humano (The International Human Genome Mapping Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001), as abordagens que relacionam genes com fenótipos específicos têm ganhado força. Assim, por exemplo, genes como o *Rgs2*, um regulador da proteína G, começam a ter suas participações na expressão de comportamentos relacionados à emocionalidade desvendadas (Yalcin *et al.*, 2004).

Devido ao exposto acima, fica clara, então, a grande importância de desenvolvermos e estudarmos modelos genéticos animais para diferentes patologias ou transtornos como, por exemplo, a ansiedade, a depressão e o alcoolismo.

### 1.7 Testes Comportamentais

Existem vários testes comportamentais descritos na literatura que tentam medir comportamentos relacionados aos transtornos humanos em animais de laboratório (Hall, 1934; File e Hyde, 1978; Crawley, 1981; Pellow *et al.*, 1985; Blanchard *et al.*, 1990; Merali *et al.*, 2003; Kalueff *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008). Eles apresentam uma grande importância na triagem ou no desenvolvimento de novas drogas ativas para os transtornos psiquiátricos humanos (Dawson e Tricklebank, 1995).

Porém, quando diversos testes comportamentais são utilizados simultaneamente em uma mesma população de roedores, raramente são encontradas correlações estatísticas altas entre diferentes variáveis que deveriam medir a mesma característica emocional (Ramos *et al.*, 1997). Isto pode sugerir que: (a) tais medidas não estão avaliando adequadamente uma dada característica emocional (File, 1995), ou (b) diferentes testes comportamentais podem estar avaliando diferentes tipos de emocionalidade, até mesmo com o envolvimento de substratos biológicos distintos (Ramos e Mormède, 1998; Ramos, 2008). Normalmente, os diferentes testes comportamentais expõem o animal, por uma quantidade de tempo variável, a um ou vários estímulos aversivos enquanto o observador faz a análise simultaneamente. Estes estímulos podem ser classificados como físicos (temperaturas extremas, choques elétricos, privação de comida) ou psicológicos (ambientes inéditos, áreas fortemente iluminadas, espaços abertos, lugares altos) (File, 1995; Ramos e Mormède, 1998).

Para que um teste possa ser considerado um bom modelo comportamental, ele deve permitir, entre outras coisas, a mensuração de respostas quantitativas/qualitativas que respondam à aplicação de drogas específicas no mesmo sentido que estas drogas atuam em humanos. Por exemplo, em um bom

modelo comportamental de ansiedade, drogas ansiolíticas (que reduzem a ansiedade em humanos) devem aumentar a exploração do ambiente aversivo do teste comportamental por parte dos animais, enquanto drogas ansiogênicas (que aumentam a ansiedade em humanos) devem diminuir a exploração do mesmo ambiente aversivo. Além disso, o modelo não deve responder a outras classes de drogas (antipsicóticos, etc.; File, 1987). Segundo Willner (1986), a validade de um modelo animal pode ser julgada por três critérios principais: (a) validade preditiva, que é a capacidade de diferenciar entre drogas que são, ou não, clinicamente eficazes na patologia humana em questão; (b) validade analógica ou por semelhança, que é avaliada com base nas qualidades comportamentais e farmacológicas cujas semelhanças com o transtorno humano podem ser demonstradas; (c) validade teórica ou por homologia, onde os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos estejam atuando no modelo, que ocorre, por exemplo, nos estudos de auto-administração de drogas (para revisão ver, van der Staay, 2006).

Basicamente, são reconhecidos dois tipos de testes comportamentais: (a) os baseados em respostas não condicionadas (exploratórios, de consumo e de comportamentos sociais) e (b) os baseados nos paradigmas de aprendizagem animal ou no condicionamento (esquiva ativa condicionada, desamparo aprendido) (Treit, 1985; Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers e Cole, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997; Rodgers *et al.*, 1997; Ramos e Mormède, 1998; Ramos e Mormède, 2006). Nos anexos deste trabalho encontram-se descritos alguns modelos comportamentais utilizados no presente estudo.

### *1.8 Modelos Genéticos Animais*

Sabe-se que diferentes linhagens de ratos ou camundongos podem responder de maneira diferente aos mesmos estímulos ambientais e que, então, a comparação simultânea destas linhagens pode revelar correlações genéticas entre diversas variáveis bioquímicas ou comportamentais (Ramos e Mormède, 1998). Portanto, o estudo comparativo de modelos genéticos pode representar uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos envolvidos nos transtornos relacionados à ansiedade, a depressão e o alcoolismo (Trullas e Skolnick, 1993; Rex *et al.*, 1996). Estes modelos genéticos normalmente são compostos de duas linhagens contrastantes que podem ser originados a partir de: (a) características que se diferenciaram aleatoriamente por cruzamentos independentes realizados em diferentes populações ou linhagens ou (b) a partir de uma seleção genética bidirecional planejada sobre uma característica específica.

A primeira alternativa seguramente é mais rápida e menos trabalhosa, pois usa linhagens já estabelecidas, porém, pode ser menos informativa do que a segunda (Ramos e Mormède, 1998). No entanto, devemos estar atentos ao fato de que nem sempre os genes importantes para a característica em estudo são polimórficos (apresentam mais de uma forma) entre as linhagens que compõem o modelo. Diversos estudos recentes têm demonstrado que linhagens isogênicas (consangüíneas) de roedores que não tinham sido intencionalmente selecionadas para características emocionais, podem constituir ferramentas interessantes no estudo destas características (Crawley e Davis, 1982; Trullas e Skolnick, 1993; Glowa e Hansen, 1994; Mathis *et al.*, 1994; Armário *et al.*, 1995; Guillot e Chapoutier, 1996; Lahmame e Armário, 1996; Rex *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997).

### 1.8.1 Linhagens Lewis e SHR

A partir de um estudo com seis linhagens isogênicas de ratos, assim chamadas porque apresentam um alto grau de homozigose entre seus indivíduos, Ramos *et al.* (1997) propuseram um novo modelo genético animal para o estudo de comportamentos relacionados à emocionalidade. Ele é composto de duas linhagens de ratos, chamadas Lewis (LEW) e SHR (*spontaneously hipertensive rats*). Posteriormente, estas duas linhagens se mostraram também um modelo genético interessante no estudo de comportamentos relacionados ao alcoolismo (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Hinojosa *et al.*, 2006; Vendruscolo *et al.*, 2006a; Chiavegatto *et al.*, 2008).

A linhagem LEW foi originada a partir de cruzamentos consangüíneos de ratos da linhagem Sprague-Dawley (Brimberg *et al.*, 2007) realizados inicialmente pela Dr. Margaret Lewis no começo do século XX. Segundo o “*rat genome database*” (<http://rgd.mcw.edu/>) (RGD) são conhecidas atualmente mais de 15 sub-linhagens de ratos LEW em todo o mundo. Os ratos LEW apresentam uma baixa atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse, quando comparados à linhagem Fischer (F344) (Calogero *et al.*, 1992; Sternberg *et al.*, 1992), sendo freqüentemente usados como modelo de doenças auto-imunes (Stohr *et al.*, 1999). Eles também são considerados importantes no estudo do abuso de diferentes drogas, tais como cocaína (Kosten *et al.*, 1994), morfina (Suzuki *et al.*, 1988a) e etanol (Suzuki *et al.*, 1988b). Sabe-se que a linhagem LEW, quando comparada com a linhagem SHR, vai pouco ao centro do CA, mostra uma rápida saída do compartimento branco no teste da CBP e passa menos tempo nos braços abertos e mais tempo nos braços fechados do LCE (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002; Izídio *et al.*, 2005a; b). Isto, aliado ao fato de que estas duas linhagens não diferem em medidas consideradas como índices de locomoção geral nos mais variados

testes comportamentais, nos permite sugerir que, comparativamente, a linhagem LEW tem um perfil de maior “ansiedade” em relação à outra linhagem deste modelo genético. Além disso, a linhagem LEW apresenta uma maior imobilidade no TNF em comparação à linhagem SHR, o que sugere que os ratos LEW têm um perfil comportamental do tipo “depressivo” (Hinojosa *et al.*, 2006). Nos estudos de alcoolismo realizados com o modelo genético LEW/SHR, os resultados não apontam para uma conclusão definitiva, ao menos em machos. As fêmeas LEW, em todos os estudos realizados anteriormente, consumiram menores quantidades de etanol do que as fêmeas SHR (Da Silva *et al.*, 2004; Vendruscolo *et al.*, 2006a). Entretanto, em machos, algumas vezes os ratos LEW consumiram menos sendo que em outras o contrário foi observado (Da Silva *et al.*, 2004; 2005; Vendruscolo *et al.*, 2006a; Chiavegatto *et al.*, 2008).

A linhagem SHR é composta de ratos que desenvolvem, a partir de certa idade, hipertensão arterial, tendo sido também obtida através de cruzamentos consangüíneos, envolvendo seleção genética, a partir da linhagem Wistar (Okamoto e Aoki, 1963). Entretanto, uma população F2 originária de um cruzamento entre as linhagens LEW e SHR, demonstrou que a pressão arterial parece não estar associada aos comportamentos relacionados à ansiedade nestas linhagens (Ramos *et al.*, 1998). Sabe-se que os ratos SHR são mais sensíveis aos efeitos hipnóticos do etanol e também consomem maior quantidade deste líquido, quando comparados aos seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) (Khanna *et al.*, 1990). Contrariamente aos ratos LEW, que apresentam uma hiporesponsividade no eixo HPA, os ratos SHR exibem um aumento maior e mais prolongado nos níveis de adrenalina e noradrenalina, frequência cardíaca e pressão sanguínea em resposta a

situações estressantes, quando comparados a algumas outras linhagens (Kirby *et al.*, 1989; Hendley e Ohlsson, 1991).

A linhagem SHR também já foi sugerida como sendo um bom modelo para o estudo de comportamentos relacionados ao déficit de atenção e de hiperatividade (Mormède *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2005; Sagvolden *et al.*, 2005) e ao abuso de drogas (Vendruscolo *et al.*, no prelo). Entretanto, os ratos SHR não diferem na locomoção total do teste do campo aberto, quando comparados com ratos F344 e Wistar (Paré, 1989). Quando comparados aos ratos LEW, os SHR aproximam-se mais dos compartimentos aversivos de diferentes testes comportamentais, independentemente do sexo (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002). Segundo o RGD, existem atualmente mais de 25 sub-linhagens de ratos SHR.

Apesar da caracterização comportamental, farmacológica e bioquímica que realizamos ao longo dos últimos anos, ainda existem dúvidas sobre o significado psicológico real das diferenças comportamentais entre as linhagens LEW e SHR. Por esta razão, é necessária uma melhor caracterização destas linhagens nos mais variados aspectos, a fim de se elucidar vias bioquímicas, mecanismos biológicos ou genes que estejam contribuindo para a expressão destes comportamentos diferenciados entre elas. Com o melhor entendimento neurobiológico destes comportamentos, nós poderemos entender melhor os transtornos relacionados à emocionalidade em humanos e até mesmo desenvolver medicamentos mais específicos e efetivos para cada um deles.

### *1.9 Estudos de QTL*

Sabe-se que grande parte da variação fenotípica existente nas mais variadas espécies é quantitativa (o que inclui as diferenças interindividuais na ansiedade,

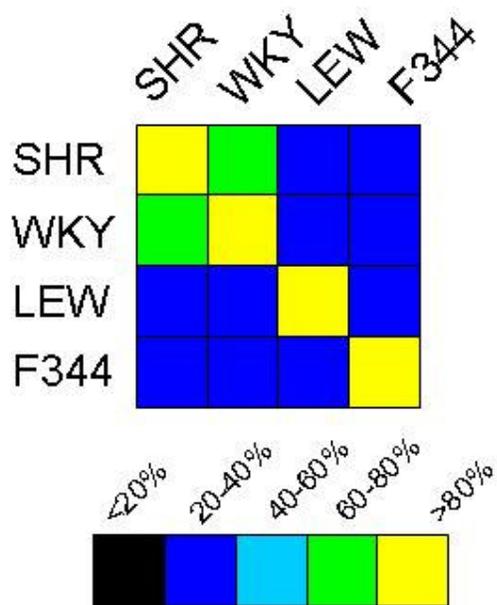
humor e inteligência e na sensibilidade às drogas de abuso) e, portanto, dependente do efeito de múltiplos genes polimórficos em interação com fatores ambientais. Existe na literatura, desde o final da década de 80, uma metodologia descrita para se mapear *loci* (regiões cromossômicas) de interesse para características quantitativas. Esta metodologia é chamada de análise de QTL (*quantitative trait loci*) e envolve o estudo genômico abrangente, podendo fornecer informações sobre associações genéticas entre diversas características fenotípicas e, também, informações que podem ajudar a elucidar os mecanismos moleculares moduladores das características em estudo (Lander e Kruglyak, 1995; Complex Trait Consortium, 2003; Flint *et al.*, 2005). Algumas estratégias que têm levado ao mapeamento de QTL incluem retrocruzamentos ou intercruzamentos realizados com linhagens isogênicas, recombinantes, congênicas ou consômicas (Wehner *et al.*, 2001; Shalom e Darvasi, 2002). Normalmente, um grande número de marcadores moleculares é utilizado, sendo que eles devem estar bem espalhados ao longo de todo o genoma do animal e também devem ser polimórficos nas linhagens parentais (Flint *et al.*, 1995). Diversos QTL encontram-se descritos para várias medidas comportamentais de medo/emocionalidade, de atividade locomotora, de abuso, preferência ou sensibilidade a drogas, ou ainda para algumas características fisiológicas (Flint *et al.*, 1995; Moisan *et al.*, 1996; Caldarone *et al.*, 1997; Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1999; Fernandez-Teruel *et al.*, 2002; Flint, 2003; Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b; Yalcin *et al.*, 2004; Flint, 2005; Llamas *et al.*, 2005; Bice *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). Muitos destes estudos foram conduzidos utilizando-se linhagens isogênicas de ratos/camundongos, assim chamados por apresentarem uma alta homologia no DNA entre os indivíduos da mesma linhagem, devido à grande taxa de endocruzamento.

Através do uso de uma população F2 proveniente de um intercruzamento entre as linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR, comercializadas na França, Ramos *et al.*, (1999) identificaram e mapearam, pela primeira vez, QTL para comportamentos relacionados à emocionalidade em ratos. Um deles foi mapeado no cromossomo 4 e afetava a locomoção central no teste do CA, uma medida possivelmente relacionada à ansiedade (Nazar *et al.*, 1997; Angrini *et al.*, 1998; para revisão ver Prut e Belzung, 2003). Este QTL, denominado inicialmente *Ofil1* (*open field inner locomotion 1*) e hoje chamado de *Anxr16* segundo o *rat genome database* (<http://rgd.mcw.edu/>) (RGD), era excepcionalmente forte, mas compreendia uma região bastante grande do cromossomo 4 (aproximadamente 78 milhões de pares de bases). Entretanto, o seu efeito foi somente observado em ratas F2 fêmeas que eram netas de avós LEW, o que coincidiria com a maior prevalência de transtornos de ansiedade em mulheres (Essau *et al.*, 2000; Bekker *et al.*, 2007). Além disso, como comentado anteriormente, os ratos da linhagem LEW apresentam maior esquiva das áreas consideradas aversivas (região central do CA) sendo assim considerados os mais “ansiosos” no modelo genético LEW/SHR. Porém, na região de *Ofil1*, os alelos LEW aumentavam a locomoção central nos animais F2, ao invés de diminuí-la, como seria esperado (um efeito transgressivo).

Como sugerido por Lander e Kruglyak (1995), os resultados de um estudo de mapeamento genético devem ser replicados para serem realmente considerados válidos. Mormède *et al.* (2002), com uma técnica de seleção baseada em marcadores moleculares, confirmaram a existência de *Ofil1* utilizando o mesmo par de linhagens do estudo original (LEW e SHR), apesar desta técnica não ter permitido o remapeamento desta região cromossômica. Com uma técnica similar, Vendruscolo *et al.* (2006a) corroboraram a importância de *Ofil1* na locomoção central do CA e

estenderam os resultados, sugerindo uma possível participação deste QTL no consumo de etanol. Próximo a esta região localizada no cromossomo 4 do rato, outros três QTL foram mapeados em trabalhos independentes. O primeiro deles influencia o consumo de etanol e foi encontrado em um estudo com as linhagens de ratos P (*alcohol-preffering*) e NP (*alcohol-nonpreffering*) (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998). De modo interessante, estas duas linhagens diferem também no seu nível de emocionalidade, com a linhagem que apresenta maior consumo de etanol (P), sendo também a que apresenta maiores níveis de ansiedade/emocionalidade (Pandey, 2005). O segundo QTL também influencia o consumo de etanol e foi encontrado em um estudo com as linhagens HEP (*high-ethanol preffering line*) e Wistar-Kyoto (WKY) (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b). Além disso, estudos posteriores com estas mesmas linhagens sugeriram que este QTL tem um efeito pleiotrópico, atuando não somente no consumo de etanol, mas também em medidas de emocionalidade, como a locomoção central no CA (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003a). Finalmente, o terceiro QTL foi encontrado em um estudo com as linhagens LEW e F344 para níveis de corticosterona endógena (Potenza *et al.*, 2004). Este conjunto de resultados recentes sugere, portanto, que nesta região do cromossomo 4 do rato existem genes importantes para características de medo/emocionalidade, estresse e consumo de etanol. Porém, existem dúvidas sobre a posição dos picos de probabilidade, ou seja, da localização exata dos quatro QTL mapeados nesta região, pois cada um deles foi identificado utilizando-se diferentes marcadores moleculares e ratos de linhagens diferentes (Ramos e Mormède, 2006). A figura 1 (<http://rgd.mcw.edu/ACPHAPLOTYPER>) demonstra a porcentagem de homologia, ao longo do cromossomo 4 do rato, em quatro das sete linhagens utilizadas nos estudos de QTL comentados anteriormente. Como pode ser visto, as linhagens SHR

e WKY apresentam uma alta homologia (60-80%), devido, provavelmente, à sua recente ancestralidade. Já as linhagens LEW e SHR, usadas no presente trabalho, apresentam uma homologia em torno de 20 a 40%.



**Figura 1** - Estimativa da homologia genética entre as linhagens SHR, WKY, LEW e F344 ao longo de todo o cromossomo 4.

Assim, no presente trabalho, um novo estudo de QTL foi realizado a partir do inter cruzamento das linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR, de origem brasileira. Basicamente, estas duas linhagens foram inter cruzadas originando animais F1 totalmente híbridos (onde 50% do material genético era proveniente de cada uma das duas linhagens parentais). Estes animais F1 foram novamente inter cruzados produzindo animais F2 (ditos segregantes), nos quais foi realizada uma análise de ligação genética através de marcadores moleculares de DNA do tipo microssatélites, concentrados no cromossomo 4.

### 1.10 Busca de genes candidatos

Em uma tentativa de encurtar o longo caminho entre a identificação do QTL e a descoberta do gene propriamente dito, por exemplo, através de técnicas fastidiosas de clonagem posicional e produção de linhagens congênicas, podemos avaliar genes candidatos que estejam já mapeados naquela região cromossômica e que sejam relacionados à característica fenotípica em questão. Por exemplo, estes genes podem ser avaliados comparativamente entre as linhagens parentais (as que deram origem ao estudo de QTL) através: da análise de DNA (*Southern Blot*, análise de SNP, seqüenciamento gênico), da expressão de RNA mensageiro (RNAm) [*Microarrays*, *Real-Time RT-PCR*, *Northern Blot*, *Total gene expression analysis* (TOGA)] ou da quantificação da forma final da proteína (*Western Blot*, imunohistoquímica). Como o rato teve o seqüenciamento do seu genoma recentemente concluído e novos genes foram identificados ao longo de todos os cromossomos deste animal (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004; Rew, 2004), as abordagens de genes candidatos têm ganhado força recentemente.

Desta maneira, no presente trabalho, nós escolhemos dois genes localizados nesta promissora região do cromossomo 4 do rato para avaliação segundo uma abordagem de gene candidato. O primeiro deles foi escolhido a partir de evidências obtidas no estudo de QTL, anteriormente comentado, com as linhagens P e NP (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998). Nele, um gene localizado na região do pico máximo de probabilidade (LOD score mais alto) foi sugerido ser o provável responsável pelo QTL para consumo de etanol (Liang *et al.*, 2003). Este gene (*Snca*) codifica para uma proteína de 140 aminoácidos chamada  $\alpha$ -sinucleína. Ela é expressa ao longo de todo o sistema nervoso central (SNC) e está em particular abundância nos terminais pré-sinápticos (Mori *et al.*, 2002), inibindo a tirosina

hidroxilase e levando assim a uma redução na síntese das catecolaminas, incluindo a dopamina (Perez *et al.*, 2002). Além disso, sugere-se que a  $\alpha$ -sinucleína diminui a atividade do transportador de dopamina (Wersinger *et al.*, 2003; Wersinger e Sidhu, 2005), prejudicando a recaptção da mesma. Sabe-se que animais *knock-out* para a  $\alpha$ -sinucleína exibem menores respostas locomotoras à anfetamina (Abeliovich *et al.*, 2000), enquanto que animais transgênicos, que super-expressam a  $\alpha$ -sinucleína, apresentam sinais de prejuízo motor associado com um decréscimo nos níveis de tirosina hidroxilase (Masliah *et al.*, 2000). A  $\alpha$ -sinucleína está presente em grande abundância no hipocampo (Petersen *et al.*, 1999; Adamczyk *et al.*, 2005), que tem participação conhecida nos transtornos de ansiedade (Bannerman *et al.*, 2004; Kalisch *et al.*, 2006). Desta maneira, o conjunto disponível de resultados sugere que a  $\alpha$ -sinucleína pode diminuir a neurotransmissão dopaminérgica, apresentando, assim, um possível efeito comportamental de interesse clínico.

O segundo gene (*Tac1r*) está mapeado no cromossomo 4 do rato na posição ~116Mb e codifica para um receptor da substância P, um mediador excitatório do SNC. Ela é o neuropeptídeo mais abundante e melhor conhecido da classe das neurocininas (família de peptídeos que têm em comum a seqüência carboxi-terminal - Phe-Met-NH<sub>2</sub>). São conhecidos três sub-tipos de receptores onde a substância P liga-se, sendo que o NK1 é o que apresenta maior afinidade por ela. Alguns resultados recentes vêm sugerindo que a substância P, assim como seu receptor NK1, pode estar envolvida na patofisiologia dos transtornos psiquiátricos, tais como os de ansiedade e depressão (Kramer *et al.*, 1998; Stahl, 1999; Saria, 1999; Varty *et al.*, 2002; Álvaro e Di Fabio, 2007). Por exemplo, Vendruscolo *et al.* (2003), utilizando um antagonista dos receptores NK1, mostraram uma sensibilidade diferente no comportamento das linhagens LEW e SHR no CA, após a administração

deste composto. Além disso, Pompei *et al.* (1997) já demonstraram uma menor expressão do gene da substância P em ratos SHR quando estes foram comparados aos seus controles normotensos (WKY). Devido à sua possível relação com os transtornos psiquiátricos humanos e a sua localização no cromossomo 4 do rato, próxima de *Ofil1* (Ramos *et al.*, 1999), o gene *Tac1r* passou a ser um alvo de grande interesse para a abordagem de gene candidato nas linhagens LEW e SHR.

### 1.11 Hipóteses

Como comentado anteriormente, os ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR diferem para uma série de aspectos comportamentais, incluindo aqueles relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol. Assim sendo, este modelo genético pode ser útil no estudo de diferentes psicopatologias que podem, eventualmente, estar associadas. Deste modo, baseado no que foi exposto anteriormente, nós gostaríamos aqui de estabelecer algumas hipóteses iniciais que foram testadas ao longo deste trabalho: 1) os diversos testes comportamentais aqui utilizados não apresentariam os mesmos significados psicológicos para machos e fêmeas; 2) o QTL *Ofil1* estaria presente também em animais das sub-linhagens LEW e SHR brasileiras, a exemplo das suas homólogas francesas, ao menos em fêmeas F2 e possivelmente também em machos; 3) a região genômica do locus *Ofil1* influenciaria diversos comportamentos ligados à emocionalidade e ao consumo de etanol apresentando, assim, um efeito pleiotrópico; 4) a correlação entre os comportamentos relacionados à ansiedade e ao consumo de etanol seria significativa e positiva; 5) existiriam QTL's influenciando outras medidas comportamentais de emocionalidade além da locomoção central no cromossomo 4 do rato; 6) o ciclo estral das fêmeas F2 poderia afetar a expressão de *Ofil1* (para

maiores detalhes ver anexos); 7) os genes da  $\alpha$ -sinucleína e/ou do receptor NK1 da substância P poderiam ser responsáveis pelos efeitos de *Ofil1*; 8) drogas farmacológicas que atuam diminuindo a atividade do sistema dopaminérgico poderiam aumentar a esquia da área central nas linhagens LEW e SHR no CA, corroborando o papel do gene da  $\alpha$ -sinucleína nas diferenças comportamentais entre as linhagens.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Em vista de todas as evidências expostas ao longo da introdução e das hipóteses mencionadas, nós pretendemos investigar a promissora região do genoma do rato situada no cromossomo 4, através de diferentes estratégias experimentais. O estudo foi basicamente dividido em duas etapas (ver Figura 2).

### 2.2 *Objetivos específicos*

A primeira estratégia experimental envolveu animais F1, F2, LEW e SHR com o intuito de:

a) calcular a herdabilidade (ver metodologia para detalhes) de alguns fenótipos exibidos nos testes do CA, CBP e TNF;

b) criar uma matriz de correlação e realizar uma análise de componentes principais (ACP) para avaliar a semelhança ou o grau de correlação entre as medidas dos diferentes testes comportamentais em machos e fêmeas (CA, CBP, TNF e consumo de etanol);

c) realizar uma nova análise de QTL envolvendo, pela primeira vez, comportamentos relacionados à ansiedade, à depressão e ao alcoolismo simultaneamente (CA, CBP, TNF e consumo de etanol);

d) remapear, com maior precisão, a posição de *Ofil1*, com a adição de mais marcadores e um maior número de animais;

e) confirmar a influência de *Ofil1* nas sub-linhagens LEW e SHR brasileiras;

f) avaliar a influência do ciclo estral na expressão deste QTL em fêmeas.

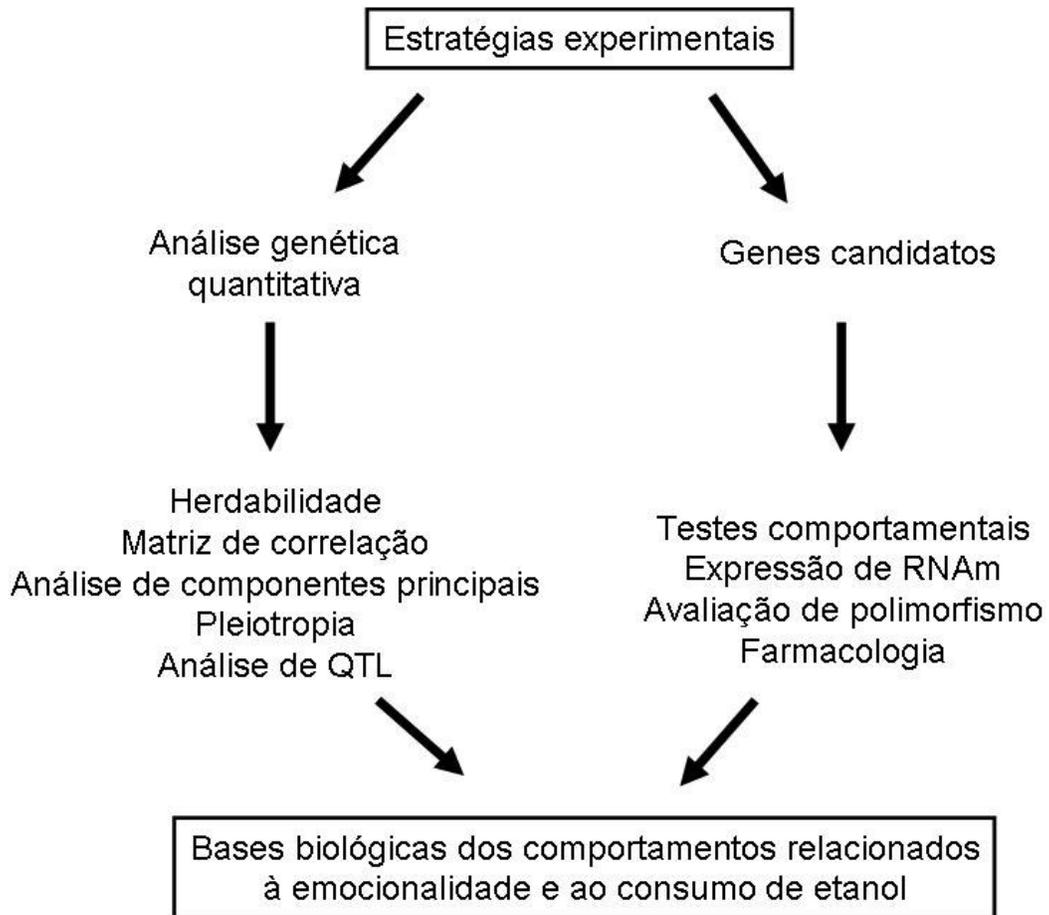
Paralelamente ao desenvolvimento desta primeira etapa, nós avaliamos o possível envolvimento de dois genes candidatos ( $\alpha$ -sinucleína e receptor NK1), o que chamamos de segunda estratégia experimental, que poderiam ser responsáveis pelos efeitos comportamentais de *Ofil1*. Para tanto, nós realizamos:

g) testes comportamentais de ansiedade (CA) e consumo de álcool com as linhagens LEW e SHR para melhor compreender as diferenças comportamentais entre elas;

h) análise da expressão de RNAm do gene da  $\alpha$ -sinucleína (*Snc $\alpha$* ) e do receptor NK1 da substância P (*Tac1r*);

i) avaliação de um polimorfismo no gene da  $\alpha$ -sinucleína nas linhagens parentais e em uma população F2 LEW/SHR segregante para testar a relação entre este polimorfismo e alguns comportamentos (CA, CBP, TNF e consumo de etanol);

j) testes comportamentais (CA, LCE e consumo de etanol) e farmacológicos utilizando a droga psicoestimulante metilfenidato (MFD), para corroborar o envolvimento do sistema catecolaminérgico e do gene da  $\alpha$ -sinucleína nas diferenças entre os ratos LEW e SHR.



**Figura 2** - Abordagens que foram realizadas neste trabalho com o intuito de avançar no conhecimento das bases biológicas de alguns comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

A linhagem LEW utilizada neste estudo é originária da *Harlan Sprague Dowley Inc.* (Indianápolis, IN), sendo obtida a partir da UNICAMP (Campinas, SP, Brasil). Já a linhagem SHR é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA) sendo obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil). As colônias de ratos LEW e SHR utilizadas neste estudo foram mantidas no laboratório de genética do comportamento durante mais de 20 gerações sob um sistema de acasalamento irmão/irmã, como recomendado para todas as linhagens consangüíneas.

Todos os animais utilizados foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, após isso, foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas (cinco ratos/gaiola) (salvo exceções de experimentos específicos que estarão descritos). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, sob um ciclo claro/escuro de 12: 12h (luzes acessas às 07h00min) com a temperatura sempre mantida a  $22 \pm 2$  °C. Os experimentos realizados em nosso laboratório estavam de acordo com as normas locais de uso dos animais na pesquisa (CEUA/UFSC; Protocolo PP00019 e 23080.002853/2006-32/UFSC).

#### Primeira estratégia experimental: Análise genética quantitativa

#### 3.2 Produção dos animais F2

Devido a questões logísticas, os animais utilizados em cada uma das duas análises de QTL realizadas neste trabalho foram sempre produzidos em dois ciclos diferentes, que nós chamaremos aqui de primeiro e segundo grupo. Assim, para a produção dos animais utilizados na primeira análise de QTL, cinco ratos SHR machos e 5 ratas LEW fêmeas, de colônias isogênicas mantidas em nosso

laboratório, foram cruzados, gerando uma população híbrida F1. Desta, 12 machos e 12 fêmeas F1 foram acasalados, produzindo 50 machos e 46 fêmeas F2 (primeiro grupo). Estes ratos F2 do primeiro grupo foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais (CA, CBP, TNF, consumo de etanol) descritos a seguir (fenotipagem). Simultaneamente, foram avaliados nos mesmos testes comportamentais, exceto os de consumo de etanol, animais das linhagens puras LEW e SHR (10/linhagem/sexo) e da geração F1 (10/sexo), com o intuito de se calcular um parâmetro genético chamado “herdabilidade”.

Em seguida, 12 machos e 12 fêmeas F1 foram novamente acasalados, produzindo mais 47 machos e 50 fêmeas F2 (segundo grupo). Estes ratos F2 do segundo grupo foram também testados na mesma bateria comportamental que os ratos do primeiro grupo (CA, CBP, TNF, consumo de etanol).

Todos os animais (LEW, SHR, F1 e F2 de ambos os sexos) tinham 8 semanas de idade no momento do teste do CA, nove na CBP e onze no TNF. Os animais F2 apresentavam 13 semanas de idade no momento do início dos testes de consumo de etanol. Em todos os testes machos e fêmeas foram testados separadamente, sendo que os machos foram sempre testados primeiro. Os testes comportamentais foram todos realizados no período vespertino das 13h30min às 18h30min. Após a conclusão dos testes comportamentais, todos os animais foram sacrificados e amostras de tecidos foram recolhidas de cada animal para extração e análise posterior de DNA (genotipagem).

Para a produção dos animais utilizados na segunda análise de QTL, que foi realizada apenas com fêmeas representando as diferentes fases do ciclo estral, três ratos SHR machos e três ratas LEW fêmeas, também das colônias isogênicas mantidas em nosso laboratório, foram cruzados, gerando uma população híbrida F1.

Desta, 10 machos e 10 fêmeas F1 foram acasalados, produzindo 50 fêmeas F2 (primeiro grupo). Posteriormente, os animais F1 foram novamente acasalados, produzindo mais 46 fêmeas F2 (segundo grupo). Cada fêmea da geração F2 (total de 96 fêmeas) foi submetida, com 10 semanas de idade, ao CA. Terminado este teste comportamental as fêmeas eram imediatamente conduzidas à CBP. Após estes dois testes comportamentais as fêmeas foram submetidas à técnica do esfregaço vaginal para avaliação da fase do ciclo estral (Hoar e Hickman, 1975).

### *3.3 Fenotipagem*

#### *3.3.1 Campo Aberto (CA)*

O aparato (Figura 3) era feito de madeira coberta com fórmica impermeável possuindo uma área de 100 x 100 cm, com o chão branco, dividido em 25 quadrados de 20 x 20 cm (linhas divisórias pretas), 9 quadrados formavam a área central e 16 a área periférica; as paredes, também brancas, tinham 40 cm de altura. A luminosidade utilizada durante os experimentos com os animais F2 foi de 7 Lux. Cada rato foi colocado no centro do aparato, que era inédito para o animal, sendo observado por 5 min. Os seguintes comportamentos foram registrados: número de quadrados centrais (centro do aparato; sem paredes ao lado) e periféricos (adjacentes às paredes) atravessados com todas as quatro patas e o número de bolotas fecais depositadas. A partir destes dados foi então calculada a locomoção total (número total de quadrados atravessados) e a porcentagem da locomoção total que seria devida à locomoção central. Além disso, também foi registrado o tempo gasto na área central do aparato. Após cada animal ser testado, o aparato era limpo com esponja embebida em álcool 10% e seco com papel toalha. O comportamento de cada animal foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato,

o que permitia o esclarecimento de qualquer dúvida posterior. Além disto, o monitoramento instantâneo possibilitava a retirada das medidas por um observador treinado localizado em uma sala adjacente, através de um circuito fechado de TV. Os métodos de limpeza e gravação foram os mesmos no teste da CBP.



**Figura 3** - O aparato comportamental do campo aberto que foi utilizado nos experimentos.

### *3.3.2 Caixa Branca/Preta (CBP)*

O aparato (Figura 4) era feito de madeira coberta com fórmica e apresentava dois compartimentos: um branco fortemente iluminado ( $\sim 750$  Lux), medindo 27x27x27 cm, cujo chão era dividido em 9 quadrados (9x9 cm); e outro preto iluminado com luz vermelha de 40W, medindo 27(A) x18(C) x27(L) cm, cujo chão era dividido em 6 quadrados (9x9 cm). Os dois compartimentos eram conectados por uma pequena abertura de 7x7 cm. Diz-se que o compartimento preto é escuro, pois o comprimento de onda vermelha é invisível ao rato, embora exista uma fraca luminosidade advinda do compartimento branco ( $\sim 20$  Lux). Ambas as lâmpadas estavam localizadas 30 cm acima do piso do aparato. Cada rato foi colocado no centro do compartimento branco e observado por 5 min, sendo os seguintes

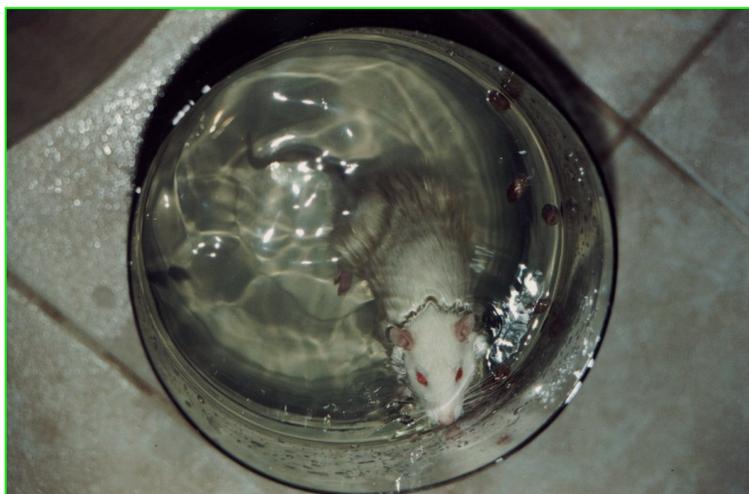
comportamentos registrados: latência para sair do compartimento branco; número de quadrados atravessados com as quatro patas e o tempo gasto em cada compartimento, além do número de transições entre os dois compartimentos (o que inclui sair do preto, entrar no branco com as quatro patas e voltar para o preto). A latência para sair do compartimento branco é considerada como o tempo que o animal, ao ser colocado neste compartimento, leva para deixar o mesmo, indo para o compartimento preto. O tempo gasto no compartimento branco não inclui esta latência inicial.



**Figura 4** - O aparato comportamental da caixa branca/preta que foi utilizado nos experimentos.

### *3.3.3 Teste do nado forçado (TNF)*

O aparato consistia em um cilindro de vidro (40 cm de altura; 18 cm de diâmetro) contendo água limpa mantida sempre entre 25°C e 27°C em um nível de aproximadamente 20 cm acima do fundo (Figura 5). A iluminação na sala de testes no momento da realização dos experimentos era de 7 lux. Os animais foram expostos a um pré-teste por 15 minutos e 24h depois, re-expostos novamente ao aparato durante 5 minutos, onde foram registrados o tempo total de imobilidade e o número de bolas fecais. O animal era considerado imóvel quando somente fazia movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. A mensuração do comportamento foi registrada por um observador treinado sentado ao lado do cilindro. Após a conclusão do teste, os animais eram secos com toalha em uma gaiola separada antes de retornarem a sua gaiola de residência. A água utilizada para a realização do teste era trocada entre cada animal.



**Figura 5** - O Teste do nado forçado (visto de cima) que foi utilizado nos experimentos.

#### *3.3.4 Consumo espontâneo de etanol*

Durante o protocolo de consumo, os animais permaneceram isolados em uma gaiola plástica com tampa metálica medindo 21Ax28Cx19L cm, e cujo chão era coberto por maravalha (Figura 6). A caixa permitia que os animais tivessem movimentos livres e acesso *ad libitum* à ração e a uma ou duas garrafas de líquido, conforme o caso. O protocolo de consumo espontâneo consistiu de: dois dias de consumo de água (habituação), dois dias de etanol forçado (10%) e livre-escolha entre etanol (2,5; 5; 10 e 20%) e água (2 dias para cada concentração com soluções v/v). O consumo de líquido era medido a cada dois dias, sempre a partir das 18h00min, através da pesagem das garrafas. No período da pesagem os animais permaneciam sem qualquer tipo de líquido para consumo. A cada dois dias as garrafinhas eram trocadas de lado para evitar qualquer tipo de efeito da posição. O peso dos animais foi medido a cada quatro dias, a partir do primeiro dia de etanol forçado (10%) até o final do protocolo. Os dados são apresentados sob a forma de

consumo absoluto (ml), g de etanol/dia/kg do peso do corpo do animal, ou ainda de preferência do animal por uma solução em relação ao consumo total de fluído [(consumo da solução / consumo total de fluído) x 100].



**Figura 6** - As caixas utilizadas nos experimentos de consumo espontâneo de etanol.

### *3.4 Análise genética quantitativa*

O cálculo da média e do erro padrão dos animais para cada variável comportamental foi realizado separadamente por grupo e por sexo. A herdabilidade dos fenótipos foi calculada a partir da fórmula a seguir:

$$h^2 = \{V F2 - [(V SHR + V LEW + V F1) / 3]\} / V F2 ;$$

onde  $h^2$  = herdabilidade e V = variância.

### *3.5 Matriz de correlação e ACP*

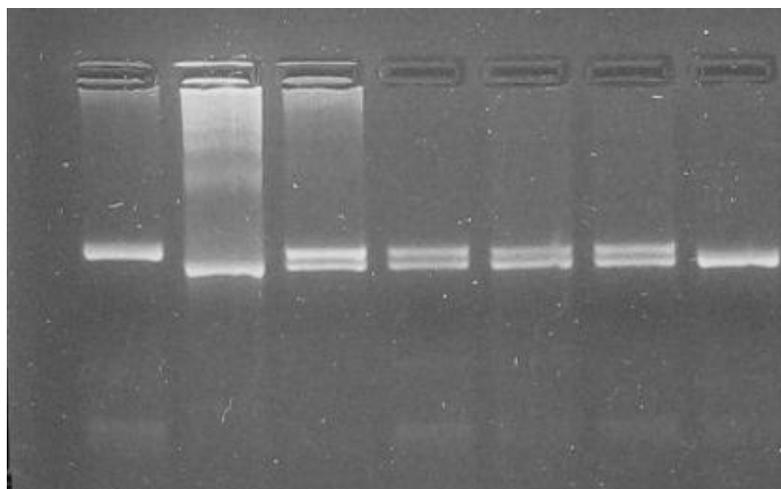
Os resultados comportamentais dos animais F2 foram submetidos à análise de correlação e de componentes principais (ACP), separadamente por sexo, com mínimo *eigenvalue* igual a 1 e rotação *Varimax raw*. Basicamente, na análise de

correlação, é realizada uma estimativa da correlação entre as variáveis selecionadas que são expressas por um coeficiente ( $r$ ), que varia de -1 a +1. Já a ACP é um método que tem por finalidade básica a redução de um grande conjunto de variáveis originais em poucas variáveis virtuais (ortogonais entre si) a partir de combinações lineares das variáveis originais. Todos os procedimentos da análise estatística foram realizados com o uso do programa STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, 2001).

### *3.6 Genotipagem*

Após a fenotipagem comportamental, os animais foram sacrificados na câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada de amostras de fígado e baço. A partir destes, o DNA de cada animal foi extraído com o kit comercial DNAzol (GibcoBRL), permanecendo estocado em freezer -20C até o momento do uso. Basicamente, as amostras (cerca de 0,5cm<sup>2</sup>) foram homogeneizadas com 1mL de kit DNAzol em um microtubo *ependorf* e depois centrifugadas (10.000g) por 10 minutos para separação por gradiente. O sobrenadante (cerca de 800µL) foi transferido a outro microtubo e misturado com 400µL de etanol gelado (100%). Esta solução foi centrifugada (4.000g) por 3 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido em 800µL de etanol gelado (75%). A solução foi, então, novamente centrifugada (4.000g) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram novamente adicionados 800µL de etanol gelado (75%). Por fim, o etanol (75%) foi descartado e o DNA que ficou no microtubo foi diluído em 250µL de NaOH (8mM) e teve o pH corrigido para 8,0 com solução de hepes (0,1M). Este método de extração proporcionava uma concentração final de DNA entre 10 e 100ng/µL. Foram testados 44 marcadores moleculares do tipo microssatélite localizados no cromossomo 4 do rato, sendo que somente 24 foram polimórficos entre as linhagens parentais. Destes

todos, 14 foram escolhidos (média de mais de 1 marcador a cada 10cM) por se distribuírem ao longo de todo o cromossomo e se localizarem nas regiões onde haviam sido encontrados QTL's prévios de interesse (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1999; Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b; Potenza *et al.*, 2004). O DNA genômico foi então amplificado através de reação de PCR (*polymerase chain reaction*) no termociclador (Px2 *Thermal cycler*), em relação aos 14 marcadores (Tabela 1). A reação de PCR continha um volume de reação de 20 $\mu$ L, onde 5 $\mu$ L de DNA genômico (concentrações variáveis de 10-100ng/ $\mu$ L) foi misturado com 5  $\mu$ L de cada *primer* (5 pmol), 0,4U de Taq polimerase (Promega) com 10 $\mu$ L de tampão 2X (Promega). O programa da reação de PCR era constituído de: a) 1 ciclo de 96°C por 4 min; 38 ciclos de [92°C por 30s; 58-62°C (conforme o marcador) por 1 min; 72°C por 31s] e 1 ciclo de 72°C por 4 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo com o auxílio do transluminador ou em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Para cada marcador, os tamanhos dos alelos do tipo LEW e SHR foram previamente determinados, para posterior classificação genotípica dos ratos F2 de acordo com a presença de cada um destes alelos (Figura 7). Os métodos de extração e genotipagem foram os mesmos para os 193 animais F2 LEW/SHR (97 machos e 96 fêmeas) da primeira análise de QTL, assim como para as 96 fêmeas F2 LEW/SHR da segunda análise de QTL (ver a seguir).



**Figura 7** - Genotipagem dos animais através de gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo. Da esquerda pra direita: um homozigoto Lewis, um homozigoto SHR, quatro heterozigotos em seqüência (LEW-SHR) e um homozigoto SHR.

**Tabela 1** - As seqüências nucleotídicas (5'-3') dos pares de *primers* (*forward* e *reverse*) para cada um dos 14 marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados na genotipagem dos animais. Estas seqüências nucleotídicas foram retiradas do RGD (<http://rgd.mcw.edu/>).

Marcador	Seqüência <i>forward</i>	Seqüência <i>reverse</i>
D4MGH22	CCTGTCATGTTATTGATGATGATG	GGTCACATGAAATTTGACCTCA
D4RAT151	TCAAAGGGTAGATGATGGAGTTT	GGTGCAAATTCAGAGGCATT
D4RAT164	AACTGTGATACTTACCTTTTGGTGT	TCCCTTCTTTGATGACCCTAA
D4WOX22	TCAGAAAAATTTAAATTGTATCTGTG	CCATATGCAAGTGTGGGTATC
D4RAT76	GTTAAGGAACCATGGGCTGA	GTATGTTTCCTTCCTGCCCC
D4RAT173	CATGCAGGGACCTTTCCTAA	TTTTGACTTCCTCCACCTGC
D4RAT40	CCACTGAGACCAAACAAGACC	TCAAGGATGGATGGTCAAGTC
D4RAT131	ATGCCCGCGAGCTCATAC	TGCCTGTACTGCTTTCAATCC

D4MGH27	TCCTTCACATACATGTGCATACC	TGAGAAGGGCTGTCAGTGG
D4MIT16	TGCATAGTCAATTTATGTCTCACA	TTGGCCTTTCTAGTAAACAGTGG
D4MGH6	GGGTCTTGTAGCATTITTTAAAGC	AGAACCAACTCCTAAACTCCTGC
D4RAT59	GCGGAATGATAGTTACTACGGC	GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT
D4MGH11	CTCAACGAACAGGTTTCATTATG	AGAAGGGATGACAATTGGTACG
D4RAT206	GCAGGAAACAGTTTACTTCATGC	AAGTAGTTGGCATGCGTGTG

---

### *3.7 Géis de agarose e poliacrilamida*

Para a genotipagem dos animais foram utilizados o gel de agarose 3% ou o gel de poliacrilamida 8% conforme a diferença entre o tamanho dos alelos nas linhagens parentais. Basicamente, o gel de agarose consistia de 7g de agarose (Promega) dissolvidas em 250mL de tampão TBE 0,5X. Esta mistura era levada ao forno microondas e aquecida até a total dissolução do pó. Com o gel ainda líquido eram adicionados 12,5µL de brometo de etídio para a visualização das bandas de DNA. Esta mistura de gel era, então, depositada no recipiente apropriado por aproximadamente 20 minutos para ocorrer a solidificação do gel. Em seguida, o gel sólido era colocado em uma cuba de eletroforese e coberto com cerca de 700mL de tampão TBE 0,5X. Depositava-se 7µL de DNA com corante (azul de bromofenol e xilenocianol) em cada poço (no máximo 42 amostras por gel) que eram submetidos a uma corrente elétrica variante e tensão fixa de 300V durante 40-70 minutos, conforme o marcador utilizado.

Basicamente, o gel desnaturante de poliacrilamida 8% consistia de 63g de uréia, 65mL de H<sub>2</sub>O destilada, 30mL de solução mãe (19 acrilamida / 1 bisacrilamida). Esta mistura era levada ao banho-maria a 56°C até a uréia ser completamente dissolvida. Após o resfriamento da solução eram adicionados 7,5 ml

de tampão TBE 10X, 700µL de persulfato de amônio (10%) e 70µL de TEMED. O gel era, então, aplicado entre as placas de vidro temperado (35 cm x 45 cm) permanecendo em repouso durante ~1,5h até a completa polimerização. Após isso, era realizada uma pré-corrída (~50mA) até a temperatura do gel atingir cerca de 50°C. As amostras de DNA, previamente desnaturadas no termociclador (95°C durante 5 minutos), eram aplicadas no gel e submetidas a uma corrida de aproximadamente 3h sob condições constantes de corrente elétrica (2100V; 45mA; 90W). Após a corrida o gel era levado a uma solução fixadora contendo etanol 100%, ácido acético P.A. e água destilada, permanecendo imerso nesta solução de 20 minutos à 24h. Em seguida, era adicionada 200mL de solução de nitrato de prata 1% e, após 20 minutos, a reação de coloração era interrompida retirando-se a placa desta solução. O gel era lavado com água quente e levado a um recipiente contendo uma solução reveladora (NaOH, água destilada e formaldeído) até as primeiras bandas de DNA aparecerem.

### *3.8 Primeira análise de QTL*

Os dados genotípicos foram analisados através do programa “QTX software for complex trait analysis”, disponível gratuitamente na *web* ([www.mapmanager.org](http://www.mapmanager.org)). Primeiramente, foi construído o mapa de ligação que forneceu a localização e a distância em centimorgans (cM) entre todos os 14 marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados. Basicamente, neste processo o programa avalia todos os LOD de ligação entre os pares de marcadores distribuídos ao longo do cromossomo com critério de  $p=0,05$ . O par com mais alto LOD score é posicionado no cromossomo e em seguida o programa tenta fazer a ligação com os outros marcadores (*Distribute function*). Após esta etapa, os dados fenotípicos foram

adicionados ao programa e a análise de QTL (*interval mapping*) foi realizada. Esta utiliza os dados fenotípicos e genotípicos e revela as regiões do genoma mais fortemente associadas às características fenotípicas de interesse. Tais regiões, que co-variam com um dado traço fenotípico, são os QTL. No programa QTX, a análise de ligação procura por QTL ao longo de todo o cromossomo a cada 1cM gerando um “*likelihood ratio statistic*” (LRS) como medida de significância do QTL (Manly *et al.*, 2001). Quanto maior o valor de LRS, maior a probabilidade de que a região genômica em questão afete o fenótipo de interesse. Este LRS pode ser interpretado como um LOD score, porém enquanto o LOD é calculado a partir do logaritmo na base 10 o LRS é calculado a partir do logaritmo na base 2, diferindo assim por um fator de 4,6. Ou seja, para que um QTL em um estudo com animais F2 seja altamente significativo é necessário um LRS de aproximadamente 19, enquanto nos estudos utilizando retro-cruzamentos um LRS de aproximadamente 15 deverá ser suficiente (Manly *et al.*, 2001).

No presente estudo os limiares de significância ou sugestividade foram estimados através do teste de permutação (nos modelos livre, aditivo ou dominante) para cada fenótipo com a análise de 1000 permutações a cada 1cM. O teste de permutação é uma abordagem mais geral para obter valores limiares de significância que são ajustados a cada caso. Neste teste, varreduras (*scan*) genômicas são repetidamente realizadas em versões embaralhadas dos dados originais para estimar um limiar de significância que é apropriado para um conjunto de dados. No geral, estes limiares definidos pelo teste de permutação se comparam bem com os valores definidos por Lander e Kruglyak (1995), mas tendem a ser menos conservadores. Assim, o uso de limiares baseados no teste de permutação pode identificar mais QTL, sem colocar em perigo a significância estatística. Além disso, o

teste de permutação pode prover limiares válidos para situações fora do padrão, quando, por exemplo, uma característica não segue a distribuição normal. Apesar de que os valores de LRS sejam variáveis conforme cada medida comportamental, neste estudo eles oscilaram em torno de 4 para QTL sugestivos e 11 para QTL significativos no modelo livre e em torno de 2 para QTL sugestivos e 8 para QTL significativos nos modelos dominante e aditivo.

Como os dados prévios (Ramos *et al.*, 1999) sugerem que existam diferenças sexuais importantes na expressão de *Ofil1*, a primeira análise de QTL neste trabalho foi realizada separadamente por sexo.

### *3.9 Segunda análise de QTL*

Na segunda análise de QTL, também foi utilizado o programa QTX, como descrito anteriormente. Entretanto, nesta análise, foram utilizadas somente fêmeas F2 LEW/SHR divididas em 2 categorias, segundo a fase do seu ciclo estral: diestro-proestro (43 fêmeas) e estro-metaestro (53 fêmeas). Para isso, as fases do ciclo estral foram induzidas com tratamento farmacológico (ver a seguir), a fim de se garantir equilíbrio entre os diferentes grupos ao longo dos experimentos comportamentais.

### *3.10 Indução do ciclo estral*

Cada uma das 96 fêmeas F2 LEW/SHR utilizadas na segunda análise de QTL foi injetada subcutaneamente (s.c.), na região dorsal do pescoço, com benzoato de estradiol (Aventis parma, Suzano, Brasil) (10µg/0,1mL) e, 48h após, com progesterona (Merck) (5mg/kg), em um volume de injeção de 1ml/kg. Ambas as drogas foram diluídas em óleo de girassol. Este procedimento, devido à ordem

cronológica planejada, nos possibilitou ter fêmeas nas fases diestro-proestro ou estro-metaestro em cada dia onde foram realizados testes comportamentais, equilibrando os tratamentos. Os animais do grupo estro-metaestro foram testados 24h após a injeção de progesterona e os animais do grupo diestro-proestro foram testados 96h após a injeção de progesterona. A confirmação da fase do ciclo de cada fêmea foi realizada após os testes do CA e CBP através da técnica de esfregaço vaginal. Basicamente, os animais foram imobilizados e, usando-se uma ponteira de pipeta adaptada, introduziu-se, superficialmente, na cavidade vaginal da rata cerca de 0,2mL de solução salina 0,9%. Após a lavagem da cavidade vaginal, com a solução salina, o fluido foi retirado e colocado em lâmina de microscópio limpa. Os esfregaços foram avaliados a fresco, sem coloração, e conduzidos sob aumento de 10X e 40X, para observação das características celulares, de acordo com o ciclo ovariano (Hoar e Hickman, 1975). Em caso de dúvida o processo era repetido. Foram encontradas 14 fêmeas em diestro, 29 em proestro; 14 em estro e 39 em metaestro, que foram agrupadas nas duas categorias anteriormente citadas. As doses e esquema experimental foram escolhidos baseados em estudos prévios da literatura e experimentos piloto de nosso laboratório (Löfgren *et al.*, 2006; Mazzuco *et al.*, 2008; Swithers *et al.*, 2008; Uphouse *et al.*, 2008).

### Segunda estratégia experimental: Genes candidatos

#### *3.11 Material biológico para análise de expressão gênica*

15 machos LEW e SHR (7-8/linhagem) foram testados, às 9 semanas de idade, no CA. Este experimento foi realizado no Instituto do Coração-SP (INCOR). Os ratos, criados no LGC, foram enviados por via aérea ao INCOR uma semana antes do início do experimento. O CA utilizado foi o mesmo descrito anteriormente,

exceto que ele apresentava iluminação de 80 lux no momento do experimento e o piso era dividido em 36 quadrados ao invés de 25. Duas horas antes do momento do teste, os animais foram isolados em gaiolas de plástico 12(A) x26(C) x15(L) cm para evitar qualquer tipo de influência de um animal no comportamento do outro. Um dia após a finalização do teste do CA, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus hipocampus e hipotálamos retirados, sendo estes imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente transportados ao freezer -70°C para futura extração de RNAm. A expressão relativa dos genes codificadores da  $\alpha$ -sinucleína, Tac1R e ciclofilina (cyph) como gene controle, foi determinada através de *real-time* RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) com o sistema de detecção de seqüência ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Além destes, foram utilizados 8 animais LEW e SHR machos que foram testados no LCE (descrito posteriormente) e CBP (descrito anteriormente) e 11 animais LEW e SHR machos que foram testados no consumo de sacarina, quinino e etanol.

### *3.12 Extração de RNAm*

As amostras de RNAm foram obtidas do hipocampo e do hipotálamo dos animais LEW e SHR. O RNA total foi extraído através do uso de TRIZOL Reagent (Invitrogen, São Paulo). A quantificação do RNA total obtido em solução aquosa foi realizada no espectrofotômetro de luz UV nos comprimentos de onda de 260 e 280nm para a verificação de possíveis contaminações protéicas. Além disso, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% comprobatória para observação das bandas das subunidades 28 e 18 do RNA ribossômico.

### *3.13 Preparação dos primers para Real time-PCR*

No presente estudo, todos os *primers sense* e *antisense*, específicos para os genes avaliados ( $\alpha$ -sinucleína, receptor NK1) foram desenhados com o auxílio do *Primer3 Software* ([http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)), a partir do estudo das seqüências conservadas de cDNA desses genes, que estavam disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Os *primers* foram selecionados pelo tamanho (18-22 nucleotídeos), conteúdo de G/C (Guanina/Citosina) ao redor de 50%, desenhados em diferentes éxons, quando possível, para evitar contaminação com DNA genômico, temperatura de anelamento entre 58-60°C, tamanho do amplicon entre 50-150 nucleotídeos com maior proximidade da terminação 3' e especificidade utilizando-se a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 3.14 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através da reação de transcrição reversa (RT) em um volume reacional de 20  $\mu$ l que continha 2  $\mu$ g de RNA total previamente analisado, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 0,5  $\mu$ g de oligo (dT), 0,5 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 200 U da enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, São Paulo). A mistura de RNA e oligo (dT) foi aquecida a 70°C por 10 min e imediatamente colocada no gelo para a adição dos demais componentes. Após isto, a reação foi incubada a 42°C por 1 hora e interrompida pelo aquecimento a 70°C por 15 min. O produto de cDNA foi tratado com 2 U de RNase H (Invitrogen) a 37°C por 20 min para remoção dos *templates* de RNA, com posterior inativação da enzima por aquecimento a 70°C por 15 min. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### 3.15 Análise da expressão gênica

As reações de Real time PCR foram realizadas no *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para cada reação (equivalente a um poço da placa), utilizou-se um volume reacional de 20 µl contendo 1 µl de cDNA *template* (com concentração previamente definida através de curvas de diluição), uma concentração final de 200 nM dos *primers sense* e *antisense* específicos para cada gene (0,32 µl de cada *primer*), 10 µl do *2X SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), e água isenta de RNase (7,96 µl). O *2X SYBR Green PCR Master Mix* contém a *AmpliTaq DNA Polymerase*, o *SYBR Green Buffer*, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *SYBR Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min para a ativação da *AmpliTaq DNA Polymerase*, seguido de 50 ciclos de 15 seg a 95°C, e 60 seg a 60°C (extensão e coleta do sinal de fluorescência). Foram utilizados controles negativos para cada gene ou para o normalizador através do controle sem *template* (ausência de cDNA) e o controle sem amplificação (ausência do par de *primers*). Todas as amostras dos diferentes grupos, incluindo os controles, foram sempre processadas em triplicata na mesma placa. Após a reação do RT-PCR, foi realizada uma curva de dissociação (*melting curve*) para cada corrida a partir da análise da temperatura de dissociação (*melting point* -T<sub>m</sub>) da dupla fita de DNA. O ciclo de dissociação foi realizado através dos seguintes passos: (a) aquecimento a 95°C por 15 seg, (b) um decréscimo progressivo da temperatura de 95°C para 60°C e manutenção dessa temperatura por 20 seg, (c) um reaquecimento (dissociação) progressivo (19 min e 59 seg) de 60°C para 95°C, e manutenção da temperatura de 95°C por 15 seg. Eventuais produtos de PCR que apresentaram curvas de dissociação com picos de T<sub>m</sub> abaixo do produto de PCR específico

(formação de dímeros de *primer*), ou ainda picos diversos com diferentes Tms ou platôs (formação de produtos não-específicos) foram descartados.

### 3.16 Análise de SNP

Setenta e três ratos machos F2 LEW/SHR foram testados no CA, na CBP, no TNF e em um teste de consumo de etanol (como descrito anteriormente). Após isto, estes animais foram sacrificados e tiveram seus fígados e baços retirados para extração de DNA a partir dos métodos descritos anteriormente. Este DNA foi então diluído a 10ng/μL com o auxílio do espectrofotômetro. O SNP (*single nucleotide polymorphism*) identificado para ratos LEW e SHR na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína (Chiavegatto *et al.*, 2008) foi determinado através da PCR seguida por digestão com uma enzima de restrição (Mbol). No procedimento, 50ng de DNA genômico foram misturados com 5 pmol de cada primer e 0,4 U de Taq polimerase (Promega) com 10μL de tampão 2X (Promega) em um volume de 20 μL de reação. As condições da PCR foram: a) 1 ciclo de 96°C por 2 min; 38 ciclos (92°C por 30s; 61°C por 1 min; 72°C por 31s) e 1 ciclo de 72°C por 4 min. A seqüência dos *primers* foi a seguinte: (*forward*) 5'-GATCTGCCAGGTGTTCTTC-3' e (*reverse*) 5'-CACACAAGAGCCTGCTACCA-3'. Cada 10 μL do produto foi então incubado com 1 U da enzima de restrição Mbol que corta especificamente no SNP, se este tiver um nucleotídeo C presente na posição +562. Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio.

Na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína, os ratos LEW apresentam naturalmente a base nitrogenada "C", enquanto que os ratos SHR apresentam a base "T". Desta maneira, como os ratos F2 são originados de um cruzamento entre LEW e SHR eles podem apresentar os genótipos CC, CT ou TT na posição +562.

### 3.17 Testes farmacológicos

Este experimento foi realizado com o intuito de corroborar o envolvimento do gene da  $\alpha$ -sinucleína e da baixa atividade do sistema dopaminérgico na esquia da área central do CA. Assim, do 23° ao 38° dia de idade os animais LEW e SHR (9 a 12 animais linhagem/sexo/tratamento) foram tratados com salina (NaCl 0,9%) ou 2mg/kg de metilfenidato (MFD) (Ritalina, Novartis) (dissolvido em salina, volume de injeção de 5ml/kg) duas vezes ao dia (injeções as 9:00h e as 13:00h) (Para maiores detalhes sobre a metodologia empregada ver o artigo Vendruscolo *et al.*, 2008 nos anexos). A média ( $\pm$  erro padrão) do peso dos animais SHR foi 35,7 $\pm$ 1,4 e 37,3 $\pm$ 1,3 g para machos no primeiro dia de tratamento; 93,5 $\pm$ 2,5 e 93,5 $\pm$ 2,6 g para machos no último dia de tratamento; 31,7 $\pm$ 1,2 e 32,2 $\pm$ 0,7 g para fêmeas no primeiro dia de tratamento; 79,4 $\pm$ 1,8 e 79,1 $\pm$ 1,4 g para fêmeas no último dia de tratamento (tratados com salina e metilfenidato, respectivamente). Já para os animais LEW foi de 45,5 $\pm$ 2,49 e 46,4 $\pm$ 1,77 para machos no primeiro dia de tratamento; 110,3 $\pm$ 460 e 112,3 $\pm$ 4,50 para machos no último dia de tratamento; 45,2 $\pm$ 2,43 e 45,22 $\pm$ 2,77 para fêmeas no primeiro dia de tratamento; 98,2 $\pm$ 4,76 e 95,56 $\pm$ 5,24 para fêmeas no último dia de tratamento (tratados com salina e metilfenidato, respectivamente). Os ratos foram desmamados aos 28 dias de idade e todos os testes comportamentais foram realizados na idade adulta às 9-10 semanas de idade (4 semanas após o fim do tratamento). Os animais foram submetidos ao CA (como anteriormente descrito), ao LCE (descrito a seguir) e a um protocolo de livre escolha (também descrito a seguir).

### 3.18 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato (Figura 8) era feito de madeira coberta com uma camada de fórmica preta, apresentando quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, distantes 52 cm do chão. Os dois braços fechados opostos (50 cm de comprimento x 10 cm de largura e paredes de 42 cm de altura) formavam uma cruz com os braços abertos (50 cm de comprimento x 10 cm de largura sendo margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura para evitar a queda dos animais do aparato). Na interseção entre os braços fechados e abertos havia uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm que dava acesso a cada um dos quatro braços. Durante a realização dos experimentos, a intensidade luminosa foi de 70 lux na plataforma central. Cada rato foi colocado na plataforma central de frente para um braço aberto e seu comportamento foi observado por 5 min. O número de entradas e o tempo gasto (com as quatro patas) dentro de cada tipo de braço foram registrados e a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada em relação ao número total de entradas.



**Figura 8** - O aparato comportamental do labirinto em cruz elevado que foi utilizado nos experimentos.

### *3.19 Protocolo de consumo em livre escolha*

Um procedimento padrão para avaliar o consumo de sacarina (7,5mM), quinino (2 $\mu$ M) e etanol foi utilizado (para detalhes ver Vendruscolo *et al.*, 2006a) com pequenas modificações. Após 5 dias de um período de habituação em caixas plásticas individuais (como as descritas anteriormente), os animais (11/linhagem) tiveram livre escolha entre duas garrafinhas contendo solução de sacarina (Vetec, Rio de Janeiro) ou água durante 2 dias consecutivos. Cada dia as garrafinhas foram pesadas, enchidas e tiveram sua posição modificada em um intervalo de 2h. Para o consumo de quinino (ICN Biomedicals, Sólón, Ohio, EUA) o teste seguiu o mesmo protocolo que para a sacarina. Na seqüência, os animais tiveram uma livre escolha entre a água ou etanol 10% (v/v). As garrafinhas foram pesadas (e reenchidas se necessário) a cada 2 dias durante o período total de 20 dias. Os dados estão expressos em g de etanol/dia/kg do peso do corpo. Entre as soluções de sacarina, quinino e etanol, os animais tiveram 2 dias só com água para beber e o peso do corpo de cada animal foi medido ao menos uma vez a cada semana.

### *3.20 Estatística*

#### Primeira estratégia experimental

Foram calculados a média e o erro padrão dos animais de cada genótipo e de ambos os sexos (LEW, SHR, F1, F2) para cada variável comportamental. A herdabilidade dos fenótipos foi calculada como descrito anteriormente. Os dados comportamentais (CA, CBP, TNF) dos animais LEW e SHR de ambos os sexos foram submetidos à ANOVA (análise de variância) de duas vias (linhagem e sexo).

A análise de correlação (de Pearson) foi realizada nos ratos F2 separadamente por sexo para 13 variáveis comportamentais selecionadas nos testes CA, CBP, TNF e consumo de etanol. O coeficiente ( $r$ ), que varia de -1 a +1 está demonstrado apenas para aquelas correlações que são significativas ( $p < 0,05$ ).

A ACP foi realizada também nos ratos F2 separadamente por sexo para as mesmas 13 variáveis comportamentais da análise de correlação. A ACP teve mínimo *eigenvalue* igual a 1 e foi submetida à rotação *Varimax raw*, como descrito anteriormente. Apenas os valores maiores que [0,4] são mostrados dentro de cada fator. Ambas as análises foram realizadas com o programa STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, 2001).

Os dados comportamentais das fêmeas submetidas ao CA e à CBP considerando a fase do ciclo estral (diestro-proestro ou estro-metaestro) foram submetidos ao teste-t de *Student* para amostras independentes.

### Segunda estratégia experimental

Os dados comportamentais (CA, LCE, CBP, TNF e consumo de etanol) e da expressão gênica através de *real-time* RT-PCR dos animais LEW e SHR machos foram submetidos ao teste-t de *Student* para amostras independentes STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, 2001).

Na análise do polimorfismo na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína foi utilizada a ANOVA de uma via para o fator “genótipo”, com o teste post hoc de Duncan sendo utilizado para comparar as médias dos grupos.

Nos experimentos farmacológicos com a droga metilfenidato (CA, LCE, consumo de sacarina e quinino) foi utilizada a ANOVA de três vias (linhagem, sexo,

tratamento). Já para o consumo de etanol foi utilizada a ANOVA de três vias de medida repetidas (linhagem, tratamento, repetição) separadamente por cada sexo.

## 4-RESULTADOS

### Primeira estratégia experimental

Os resultados dos testes comportamentais relacionados à emocionalidade (CA, CBP, TNF) realizados com os animais LEW, SHR, F1 e F2 de ambos os sexos encontram-se exibidos na Tabela 2 e Figura 9. Como mostrado na ANOVA de duas vias realizada com as duas linhagens parentais e excluindo as gerações híbridas, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhagens para todas as medidas exceto a latência, a locomoção no compartimento preto e a defecação na CBP. Em todos os casos, os ratos SHR se aproximaram mais dos compartimentos aversivos do que os ratos LEW. Além disso, os SHR também foram os ratos que passaram menor tempo em imobilidade no TNF (Tabela 2; Figura 9). Foram encontradas também diferenças relacionadas ao sexo para todas as medidas exceto a defecação no CA, CBP e TNF, a latência na CBP e o tempo de imobilidade no TNF (Tabela 2; Figura 9). Em todos os casos, as fêmeas se aproximaram mais das áreas aversivas do CA e CBP. Em machos, em diversos comportamentos, os animais F1 ou F2 não foram intermediários em relação às médias dos ratos LEW ou SHR, como se esperaria em uma herança aditiva. Enquanto isso, em fêmeas, os ratos F1 ou F2 foram sempre intermediários entre as médias dos ratos LEW e SHR, com exceção da variável tempo de imobilidade no TNF, sugerindo maior efeito de aditividade e menor efeito de dominância neste sexo (Tabela 2).

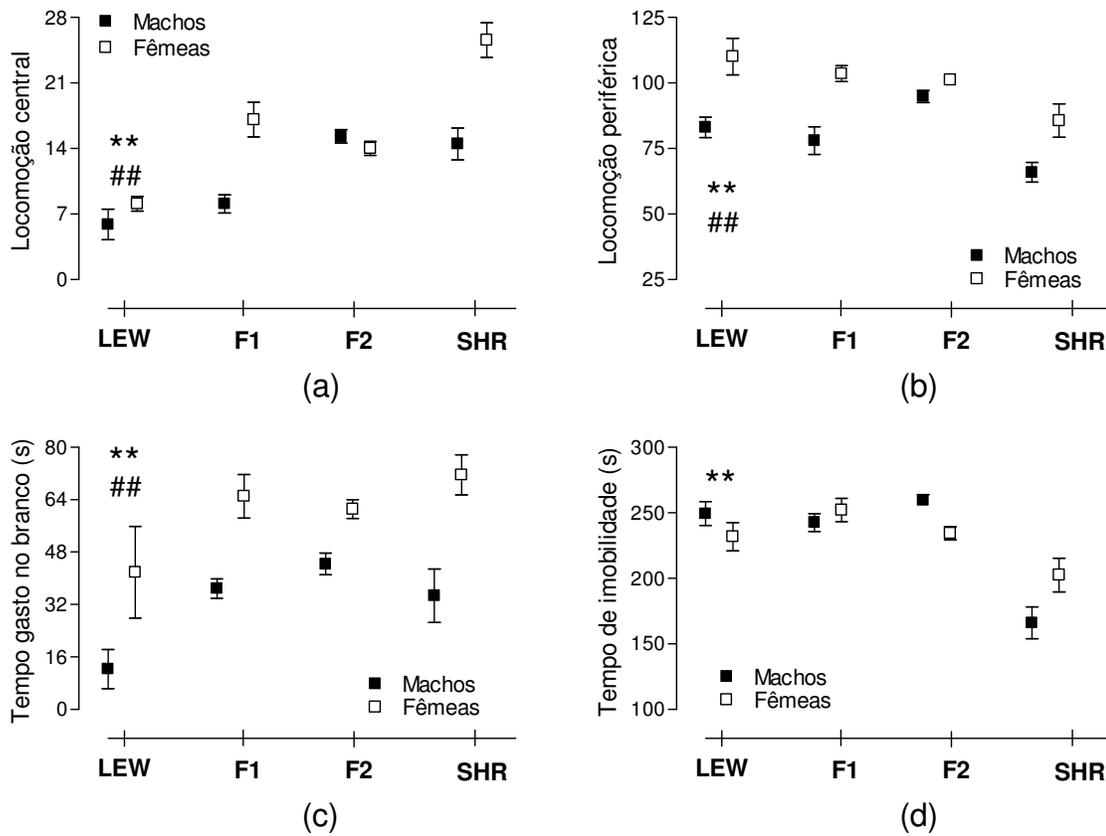
**Tabela 2** – Médias e erros padrão dos comportamentos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos (esquerda) e fêmeas (direita).

	Lewis machos (n=10)	SHR machos (n=10)	F1 machos (n=10)	F2 machos (n=97)	Lewis fêmeas (n=10)	SHR fêmeas (n=10)	F1 fêmeas (n=10)	F2 fêmeas (n=96)
Tempo no centro CA	12,4±4,58 ** #	27,1±3,31	30,8±10,46	23,4±1,28	14,2±3,08	39,1±2,17	29,1±4,14	19,8±1,20
Defecação CA	2,2±0,89 *	0,3±0,21	2,3±0,80	1,82±0,23	1,3±0,76	0±0	0±0	0,43±0,12
Latência CBP	9,3±2,03	22,3±11,49	4,3±1,27	6,7±5,12	7,7±1,78	7,1±3,03	6,4±1,4	6,5±0,57
Tempo no preto CBP	268±8,58 ** #	210,1±16,54	226,3±4,60	221,1±2,18	226,4±17,31	177,6±10,19	199,1±7,13	202,1±3,46
Transições CBP	1,2±0,51 ** ##	2,9±0,59	3,5±0,22	3,7±0,70	3,4±1,02	5,7±0,33	5,6±0,4	4,8±0,18
Locomoção branco CBP	8,9±2,58 ** ##	15,6±2,39	18,3±0,80	19,3±1,52	21±4,99	31,9±1,28	31±2,32	26,5±0,85
Locomoção preto CBP	28,5±2,93 ##	26,8±3,04	28,2±1,53	27,0±1,26	41,6±3,70	37,7±2,10	37,3±1,07	33,5±0,83
Defecação	0,4±0,40	0±0	0±0	0,1±0	0±0	0±0	0±0	0±0

CBP

Defecação	6±0,42 **	2,7±0,52	5,3±0,79	4,76±0,19	4,9±0,59	3,2±0,70	3,8±0,51	4,5±0,22
TNF								

A ANOVA foi realizada apenas para os animais das linhagens parentais (LEW e SHR). \*\* p<0,01; \* p<0,05 e ## p<0,01; # p<0,05 efeito geral de linhagem e sexo, respectivamente. **Legenda das variáveis:** CA= campo aberto; CBP= caixa branca/preta; TNF= teste do nado forçado.



**Figura 9** – Médias e erros padrão dos comportamentos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos e fêmeas. (a) locomoção central no CA; (b) locomoção periférica no CA; (c) tempo gasto no compartimento branco da CBP e (d) tempo de imobilidade no TNF. A ANOVA foi realizada apenas para os animais das linhagens parentais (LEW e SHR). \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$  efeito geral de linhagem e sexo, respectivamente.

Os resultados dos cálculos de herdabilidade de alguns comportamentos dos testes do CA, CBP e TNF estão exibidos na Tabela 3. Este parâmetro pode variar de 0 até 1 e é definido como a proporção da variabilidade fenotípica que é explicada pela variabilidade genética total. A característica mais herdável para os machos foi a locomoção periférica no CA (69%) e, para as fêmeas, o tempo de imobilidade no

TNF (60%). Os machos também apresentaram uma alta herdabilidade para a locomoção central no CA e tempo de imobilidade no TNF (ambos 66%). Em todos os casos, a herdabilidade foi mais alta em machos do que em fêmeas.

**Tabela 3** – Herdabilidade ( $h^2$ ) de quatro traços fenotípicos calculados a partir da análise de ratos LEW, SHR, F1 (LEW x SHR) e F2 (F1 x F1) machos e fêmeas.

	Locomoção central no CA	Locomoção periférica no CA	Tempo no compart. branco CBP (s)	Tempo de imobilidade no TNF (s)
$h^2$ machos	0.66	0.69	0.22	0.66
$h^2$ fêmeas	0.50	0.31	-	0.60

**Legenda das variáveis:**  $h^2$ =herdabilidade; CA= campo aberto; Tempo no compart. branco CBP= tempo no compartimento branco da caixa branca/preta; TNF= teste do nado forçado.

Alguns resultados da matriz de correlação originada a partir da análise de machos e de fêmeas F2 (Tabelas 4 e 5) encontram-se descritos abaixo. Em machos, dentro de um mesmo teste, no CA a locomoção central se correlacionou positivamente com a locomoção periférica (0,32); na CBP o tempo no compartimento branco se correlacionou negativamente com o tempo no compartimento preto (-0,93) e o tempo no compartimento preto negativamente com a locomoção no compartimento branco (-0,86); o consumo de etanol forçado se correlacionou positivamente com o consumo de etanol 10% (0,40); o consumo de etanol 2,5% positivamente com o consumo de etanol 5% (0,49) e o consumo de etanol 5% positivamente com o consumo de etanol 10% (0,67). Já em relação às correlações encontradas entre diferentes testes, podemos destacar aquela entre a locomoção

central e a locomoção no compartimento branco (0,19); entre a locomoção periférica e a locomoção no compartimento branco (0,28); entre o tempo no compartimento branco e o consumo de etanol 5% (0,26); o tempo de imobilidade com o consumo de etanol 2,5% (0,23) e entre a defecação no TNF e o consumo de etanol 5% (0,17) (Tabela 4).

Em fêmeas, dentro de um mesmo teste, a locomoção central também se correlacionou positivamente com a locomoção periférica (0,27); o tempo no compartimento branco negativamente com o tempo no compartimento preto (-0,94) e o tempo no compartimento preto negativamente com a locomoção no compartimento branco (-0,80); o consumo de etanol forçado se correlacionou positivamente com o consumo de etanol 5% (0,45) e o consumo de etanol 10% positivamente com o consumo de etanol 20% (0,49) (Tabela 5). Em relação às correlações encontradas entre diferentes testes, podemos destacar aquela entre a locomoção central e a locomoção no compartimento branco (0,42); entre a locomoção periférica e a locomoção no compartimento branco (0,41); e entre o tempo no compartimento preto e a defecação no TNF (-0,21) (Tabela 5). Ao contrário de machos, em fêmeas não houve correlação entre variáveis de consumo de etanol e medidas de emocionalidade da CBP ou do TNF.

**Tabela 4** - Matriz de correlação originada a partir da análise de 13 variáveis comportamentais nos testes do campo aberto, caixa branca/preta, nado forçado e consumo de etanol. Foram utilizados 97 machos F2 LEW/SHR. Somente os coeficientes de correlação (r) significativos são mostrados. Legenda das variáveis: CA = campo aberto; TNF = teste do nado forçado.

	Locomoção periférica	Defecação no CA	Tempo no branco	Tempo no preto	Locomoção no branco	Imobilidade	Defecação no TNF	Etanol forçado	Etanol 2.5%	Etanol 5%	Etanol 10%	Etanol 20%
<b>Locomoção central</b>	0.32		0.16	-0.15	0.19							
<b>Locomoção periférica.</b>		-0.15	0.15	-0.15	0.28							
<b>Defecação no CA</b>			-0.18	0.15	-0.18				-0.01	-0.03		-0.01
<b>Tempo no branco</b>				-0.93	0.84				0.33	0.26	0.08	-0.03
<b>Tempo no preto</b>					-0.86				-0.21	-0.23		-0.03
<b>Locomoção no branco</b>						-0.15			0.16	0.18	0.02	0.06
<b>Imobilidade</b>									0.23	-0.00	0.08	-0.04
<b>Defecação no TNF</b>									0.05	0.17		
<b>Etanol forçado</b>									0.37	0.34	0.40	
<b>Etanol 2.5%</b>										0.49	0.47	-0.09
<b>Etanol 5%</b>											0.67	0.32
<b>Etanol 10%</b>												0.47

**Tabela 5** - Matriz de correlação originada a partir da análise de 13 variáveis comportamentais nos testes do campo aberto, caixa branca/preta, nado forçado e consumo de etanol. Foram utilizadas 96 fêmeas F2 LEW/SHR. Somente os coeficientes de correlação (r) significativos são mostrados. Legenda das variáveis: CA = campo aberto; TNF = teste do nado forçado.

	Locomoção periférica	Defecação no CA	Tempo no branco	Tempo no preto	Locomoção no branco	Imobilidade	Defecação no TNF	Etanol forçado	Etanol 2.5%	Etanol 5%	Etanol 10%	Etanol 20%
Locomoção central	0,27		0,36	-0,33	0,42							
Locomoção periférica.			0,28	-0,25	0,41							
Defecação no CA												
Tempo no branco				-0,94	0,79							
Tempo no preto					-0,80		-0,21					
Locomoção no branco												
Imobilidade												
Defecação no TNF												
Etanol forçado									0,29	0,45	0,34	
Etanol 2.5%										0,34		
Etanol 5%											0,31	0,25
Etanol 10%												0,49

O resultado da ACP para 13 medidas comportamentais selecionadas dos quatro diferentes testes comportamentais realizados com os animais F2 encontra-se exibido nas Tabelas 6-7. Os dados obtidos a partir da matriz de correlação foram rotados (*Varimax raw*), sendo encontrados 5 fatores principais com *eigenvalue* maior do que 1, explicando em conjunto 72% da variância total dos dados em machos e 67% em fêmeas.

Em machos, o primeiro fator, que correspondeu a 23% da variância total, compreende apenas as medidas do teste da CBP: tempo e locomoção no compartimento branco e tempo no compartimento preto. O segundo fator compreende apenas medidas do consumo de etanol: consumo de etanol forçado e consumo de etanol em livre-escolha a 5, 10 e 20%. O fator 3 contém todas as medidas do teste do CA: locomoção central e periférica e defecação. Já o fator 4 correlacionou as medidas de consumo de etanol (consumo de etanol forçado e consumo de etanol em livre-escolha 2,5%) com o tempo de imobilidade no TNF. Por fim, o quinto fator foi representado apenas pela defecação no TNF (Tabela 6).

Em fêmeas, o primeiro fator, que correspondeu a 24% da variância total, compreende medidas do teste da CBP (tempo e locomoção no compartimento branco e tempo no compartimento preto) e a locomoção central no CA, indicando que as fêmeas que se aproximaram mais do centro do CA também se aproximaram mais da área branca da CBP. O segundo fator compreende apenas medidas do consumo de etanol: consumo de etanol em livre-escolha a 10 e 20%. O fator 3 contém as outras medidas do consumo de etanol (consumo de etanol forçado e consumo de etanol em livre-escolha a 2,5 e 5%) e a defecação no TNF. O fator 4 correlacionou as medidas do CA (locomoção central e periférica) com o tempo de imobilidade no TNF, mostrando que as fêmeas que se aproximaram mais do centro

do CA também ficaram menos imóveis no TNF. Por fim, o quinto fator foi representado pela defecação no CA (Tabela 7). Tais resultados sugerem que, em fêmeas, há mais aspectos comuns entre os diferentes testes de emocionalidade do que em machos.

**Tabela 6** - Análise de componentes principais (ACP) de 13 traços fenotípicos medidos nos 97 ratos machos da geração F2 LEW/SHR. Escores maiores do que 0,4, produzidos por uma rotação *Varimax raw*, são mostrados para cada fator. CA = campo aberto e TNF = testes do nado forçado.

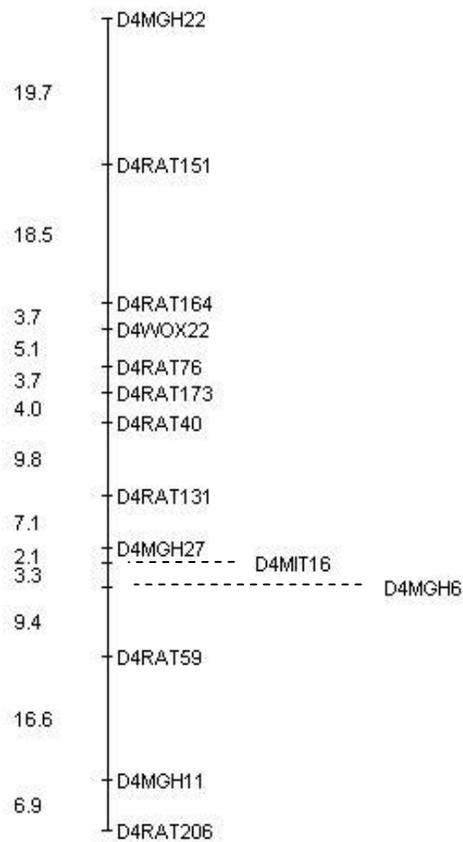
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
Locomoção central (CA)			-0,72		
Locomoção periférica (CA)			-0,71		
Defecação (CA)			0,52		
Tempo comp. branco (s)	0,95				
Tempo comp. preto (s)	-0,96				
Locomoção comp. branco	0,92				
Tempo de imobilidade (TNF)				0,81	
Defecação (TNF)					0,85
Etanol forçado (10%)		0,40		0,42	
Etanol (2.5%)				0,64	
Etanol (5%)		0,74			
Etanol (10%)		0,87			
Etanol (20%)		0,78			
Variância total (%)	23	17	11	12	9

**Tabela 7** - Análise de componentes principais (ACP) de 13 traços fenotípicos medidos nas 96 ratas fêmeas da geração F2 LEW/SHR. Escores maiores do que 0,4, produzidos por uma rotação *Varimax raw*, são mostrados para cada fator. CA = campo aberto e TNF = testes do nado forçado.

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
Locomoção central (CA)	0,42			-0,52	
Locomoção periférica (CA)				-0,43	
Defecação (CA)					-0,94
Tempo comp. branco (s)	0,94				
Tempo comp. preto (s)	-0,94				
Locomoção comp. branco	0,89				
Tempo de imobilidade (TNF)				0,78	
Defecação (TNF)			0,44		
Etanol forçado (10%)			0,62		
Etanol (2.5%)			0,71		
Etanol (5%)			0,76		
Etanol (10%)		0,83			
Etanol (20%)		0,78			
Variância total (%)	24	12	13	10	8

O mapa genético produzido a partir da análise de ligação envolvendo todos os 289 animais F2 produzidos e os 14 marcadores moleculares utilizados encontra-se exibido na figura 10. Os marcadores utilizados originaram um mapa de ligação de 111cM, se aproximando bastante dos 114cM (mapa FHH x ACL) ou dos 102cM (mapa SHRSP x BN) que o RGD considera que o cromossomo 4 contenha. A ordem de posicionamento entre os marcadores ao longo do cromossomo 4 gerada pelo nosso estudo também confirma os dados publicados no RGD (<http://rgd.mcw.edu/>). Segundo a base de dados do genoma do rato (<http://www.nih.gov/niams/scientific/ratgbase>), o cromossomo 4 contém cerca de 187 megabases (Mb). Assim, os nossos marcadores cobriram toda a extensão do cromossomo, pois o marcador mais proximal (D4MGH22) está mapeado na posição de 4Mb e o mais distal (D4RAT206) na posição 182-186Mb\*.

\*A posição exata de D4RAT206 não está detalhada no RGD.



**Figura 10** - Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 14 marcadores utilizados em todos os animais da população F2 neste estudo (289; sendo 192 fêmeas e 97 machos). A linha vertical representa o cromossomo 4 onde estão demonstradas as posições de cada marcador. As distâncias entre eles estão representadas em centimorgans (cM). D4MGH22 é o marcador mais proximal e D4RAT206 o mais distal, dentre os utilizados neste cromossomo.

Na primeira análise de QTL do cromossomo 4, foram encontrados cinco QTL significativos (Tabela 8) e seis QTL sugestivos nos machos (Tabela 9). Estes cinco

QTL significativos influenciaram medidas de comportamentos relacionados à ansiedade nos testes do CA e da CBP e do consumo de etanol. Destes cinco QTL, quatro foram encontrados no modelo livre e um no modelo aditivo. O primeiro QTL significativo no modelo livre (locomoção central no CA) foi encontrado próximo ao marcador D4MGH27 e alcançou um LRS de 14,4 explicando 14% da variância total (Figura 11). Este QTL, no entanto, parece apresentar dois picos distintos acima do nível de significância (Figura 11), sugerindo que poderiam existir na verdade ao menos dois QTL significativos para o mesmo comportamento neste cromossomo. O segundo, para a defecação no CA, foi encontrado próximo ao marcador D4RAT76 e alcançou um LRS de 14,5 explicando, também, 14% da variância total (Figura 12). O terceiro, para a locomoção periférica, foi encontrado perto do marcador D4RAT131 no modelo aditivo, com LRS de 8,8 explicando 9% da variância total dos dados (Tabela 8). O quarto QTL, afetou três comportamentos diferentes na CBP próximo ao marcador D4MGH11: locomoção no compartimento branco, com um LRS de 14,3 no modelo livre explicando 14% da variância total; tempo gasto no compartimento preto, com um LRS de 17,4 no modelo livre explicando 16% da variância total e tempo gasto no compartimento branco, com um LRS de 10,4 no modelo dominante explicando 10% da variância total (Tabela 8). Por fim, o quinto QTL significativo foi encontrado no modelo livre no teste de consumo de etanol (consumo de etanol forçado), próximo ao marcador D4RAT206, com um LRS de 10,8 e explicando 11% da variância total (Figura 12). O QTL que influenciou os três diferentes comportamentos na CBP está localizado na porção distal do cromossomo 4 e este resultado pode sugerir que o (s) gene (s) que afetam estes comportamentos diferentes sejam os mesmos (efeito pleiotrópico) (Figura 13).

**Tabela 8** - QTL significativos identificados nos ratos machos na primeira análise de QTL com os animais F2 LEW/SHR.

Fenótipo	Marcador	Localização (cM)	LRS (machos)	% variância	F	p	Modelo	L/L	L/S	S/S
Locomoção central CA	D4MGH27	73	14,4	14	7,53	0,00092	livre	19,24±1,71	15,19±0,91	11,75±1,12
Defecação CA	D4RAT76	48	14,5	14	7,59	0,00087	livre	2,73±0,46	0,91±0,25	2,29±0,44
Locomoção periférica CA	D4RAT131	64	8,8	9	4,84	0,00998	aditivo	102,38±6,67	97,02±2,84	83,58±3,94
Locomoção comp.branco CBP	D4MGH11	104	14,3	14	7,46	0,00098	livre	23,38±1,18	16,90±1,00	18,56±1,61
Tempo comp. branco CBP	D4MGH11	97	10,4	10	4,96	0,00896	dominante	55,90±4,12	37,0±3,73	43,19±5,52
Tempo comp.preto CBP	D4MGH11	103	17,4	16	9,15	0,00023	livre	203,10±4,66	233,15±4,52	221,96±6,29
Etanol forçado	D4RAT206	110	10,8	11	5,59	0,00509	livre	20,92±1,78	15,40±0,80	18,18±1,08

**Legenda das variáveis:** CA= campo aberto; CBP = caixa branca/preta; comp.= compartimento; cM= centimorgan; LRS= likelihood ratio statistic; L/L, L/S, S/S= genótipos dos animais segundo o marcador utilizado. No caso do QTL ser encontrado no intervalo entre dois marcadores, os dados do marcador que tem o valor de p mais significativo está mostrado na tabela. Cada cor de linha diferente representa um QTL, sendo que o encontrado para a CBP parece ser pleitrópico, pois influencia três diferentes medidas comportamentais deste teste.

**Tabela 9** – QTL sugestivos identificados nos ratos (machos e fêmeas) na primeira análise de QTL realizada com os animais

F2 LEW/SHR.

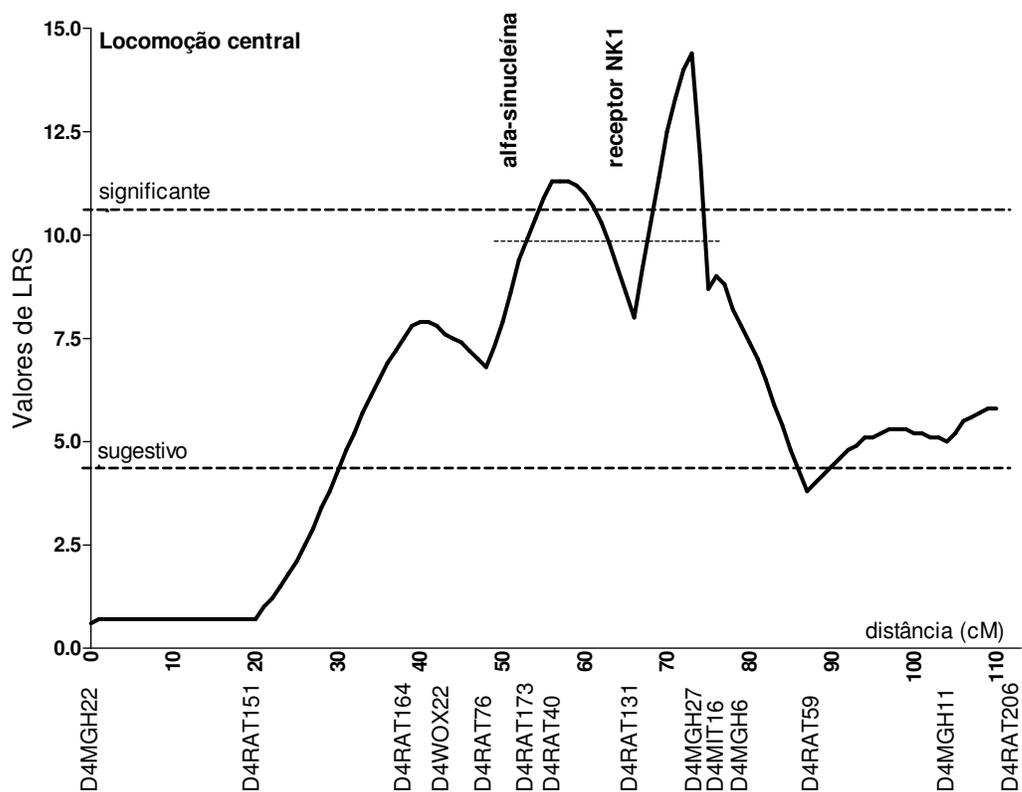
Fenótipo	Marcador	Localização (cM)	LRS	F	p	Modelo	L/L	L/S	S/S
<b>Machos</b>									
Tempo no centro CA	D4RAT206	110	2,9	1,56	0,21479	Aditivo	26,38±2,01	25,76±1,52	21,07±2,41
Consumo Etanol 20%	D4RAT206	110	4,3	2,26	0,10996	Aditivo	4,13±0,47	3,47±0,28	3,03±0,31
Locomoção comp. preto CBP	D4MGH11	104	7,8	3,94	0,02271	Livre	29,48±1,57	24,56±1,09	28,04±1,42
Latência CBP	D4MGH11	105	4,9	2,39	0,09710	Livre	8,24±1,09	5,59±0,67	6,44±0,98
Consumo Etanol 2,5%	D4RAT164	39	4,7	2,34	0,10163	Livre	0,39±0,11	0,61±0,10	0,80±0,13
Consumo Etanol 5%	D4RAT151	26-28	4,6	1,79	0,17197	Livre	0,66±0,09	0,68±0,10	0,98±0,19
Consumo Etanol 10%	D4RAT151	27	7,8	3,13	0,04828	Livre	1,65±0,21	1,58±0,14	2,44±0,43
Consumo Etanol 10%	D4MIT16	75	4,4	2,30	0,10572	Dominante	1,32±0,14	2,10±0,24	1,93±0,39
Defecação TNF	D4MGH27	73	6,9	3,46	0,03537	Livre	4,40±0,36	5,25±0,27	4,13±0,40

## Fêmeas

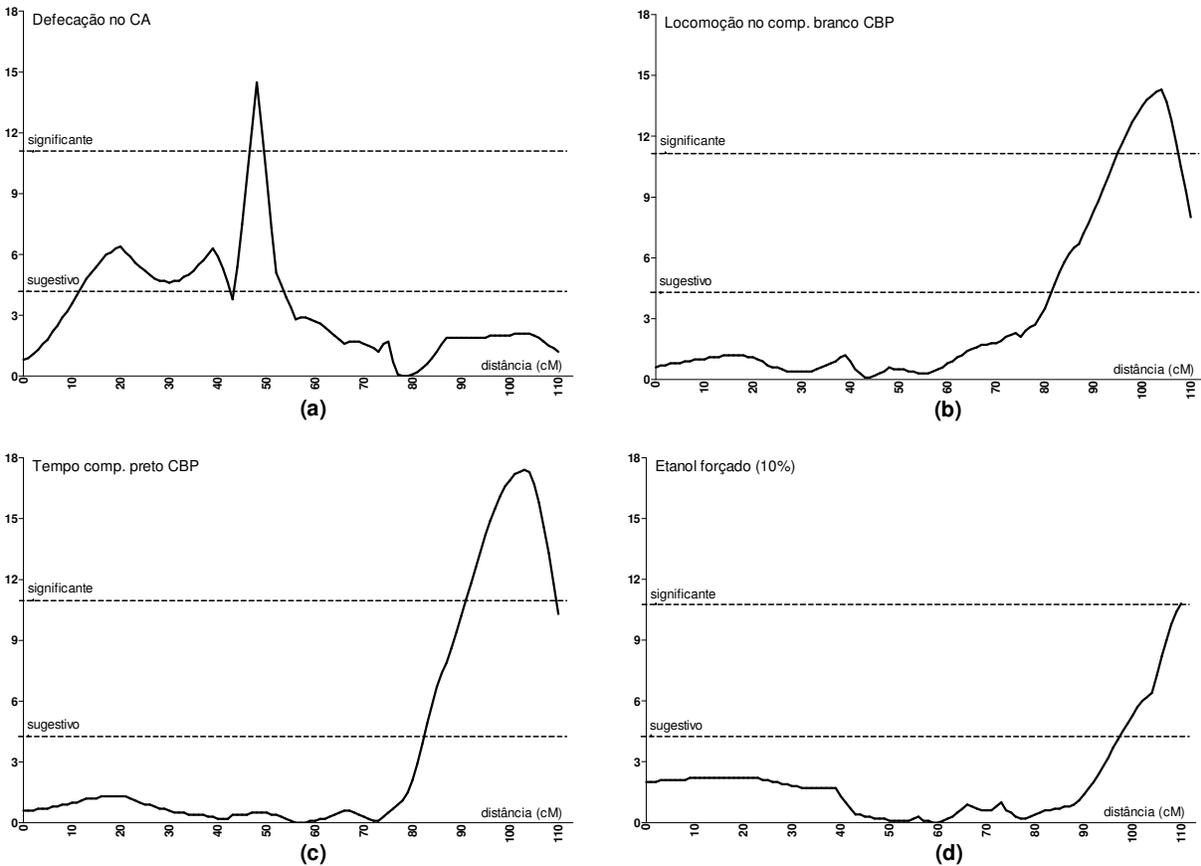
Locomoção central CA	D4MGH27	74	5,0	2,44	0,09243	Livre	10,71±1,44	15,16±1,05	13,62±1,43
Consumo Etanol 20%	D4MGH27	73-75	2,8	1,42	0,24612	Dominante	5,85±0,72	8,65±0,96	8,12±0,64
Defecação CA	D4RAT76	48	5,1	2,53	0,08482	Livre	0,81±0,31	0,21±0,09	0,50±0,32
Tempo no centro CA	D4RAT76	48	6,9	3,45	0,03600	Livre	16,92±2,09	22,62±1,74	15,89±2,08
Tempo no centro CA	D4RAT59	87	6,4	3,19	0,04592	Livre	14,00±2,10	2,81±1,65	19,38±2,29
Locomoção comp. preto CBP	D4WOX22	43	3,4	1,66	0,19643	Livre	35,92±1,59	32,79±1,22	32,06±1,25
Locomoção comp. preto CBP	D4RAT59	87	6,1	3,04	0,05263	Livre	37,28±1,81	32,05±1,12	34,19±1,49
Tempo de imobilidade TNF	D4RAT151	20	2,6	1,48	0,23253	Dominante	248,30±8,87	232,24±6,81	224,91±10,53
Tempo de imobilidade TNF	D4RAT131	60-63	3,7	1,76	0,17825	Dominante	250,64±6,92	230,89±6,96	226,05±11,15
Defecação TNF	D4MGH22	2-7	4,4	2,16	0,12131	Aditivo	4,94±0,37	4,44±0,35	3,68±0,32
							6,88±1,00	8,25±0,87	9,78±1,57

Consumo Etanol 20%	D4MGH22	8-11	3,0	1,48	0,23217	Dominante			
Consumo Etanol 5%	D4RAT173	52	2,6	2,10	0,12822	Aditivo	2,32±0,47	2,33±0,20	3,31±0,55
Locomoção periférica CA	D4RAT40	56	4,9	2,42	0,09493	Livre	105,09±3,73	102,60±2,40	92,79±5,64

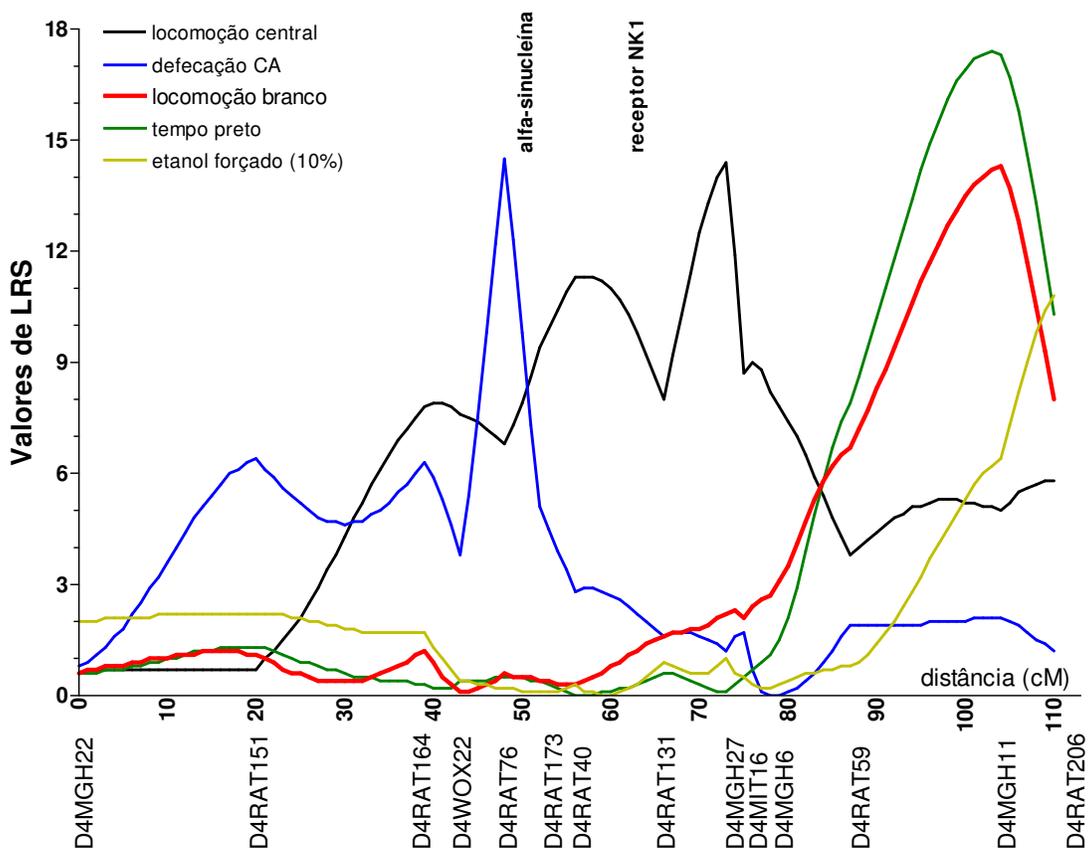
**Legenda das variáveis:** cM= centimorgan; comp.= compartimento; CA= campo aberto; CBP = caixa branca/preta; TNF = teste do nado forçado; LRS= likelihood ratio statistic; L/L, L/S, S/S= genótipos dos animais segundo o marcador utilizado (L = Lewis e S = SHR). No caso do QTL ser encontrado no intervalo entre dois marcadores, os dados do marcador que tem o valor de p mais significativo está mostrado na tabela. Cada cor de linha diferente representa um QTL, ou seja, em casos onde mais de uma linha apresente a mesma cor o efeito do QTL é considerado como sendo pleiotrópico.



**Figura 11** - QTL significativo encontrado para a locomoção central no CA na análise de ligação com os 97 machos F2 LEW/SHR (modelo livre). A posição aproximada dos genes candidatos  $\alpha$ -sinucleína e receptor NK1 estão demonstradas no gráfico. Os nomes dos 14 microssatélites utilizados estão colocados no eixo X. O traço pontilhado que corta a curva de QTL demonstra a estimativa do intervalo de confiança de 96.8% através do método de *drop-off*. A análise com o método de *bootstrap* sugere que podem existir outros 2 QTL (um a esquerda e outro a direita do QTL principal) influenciando esta medida comportamental neste cromossomo.



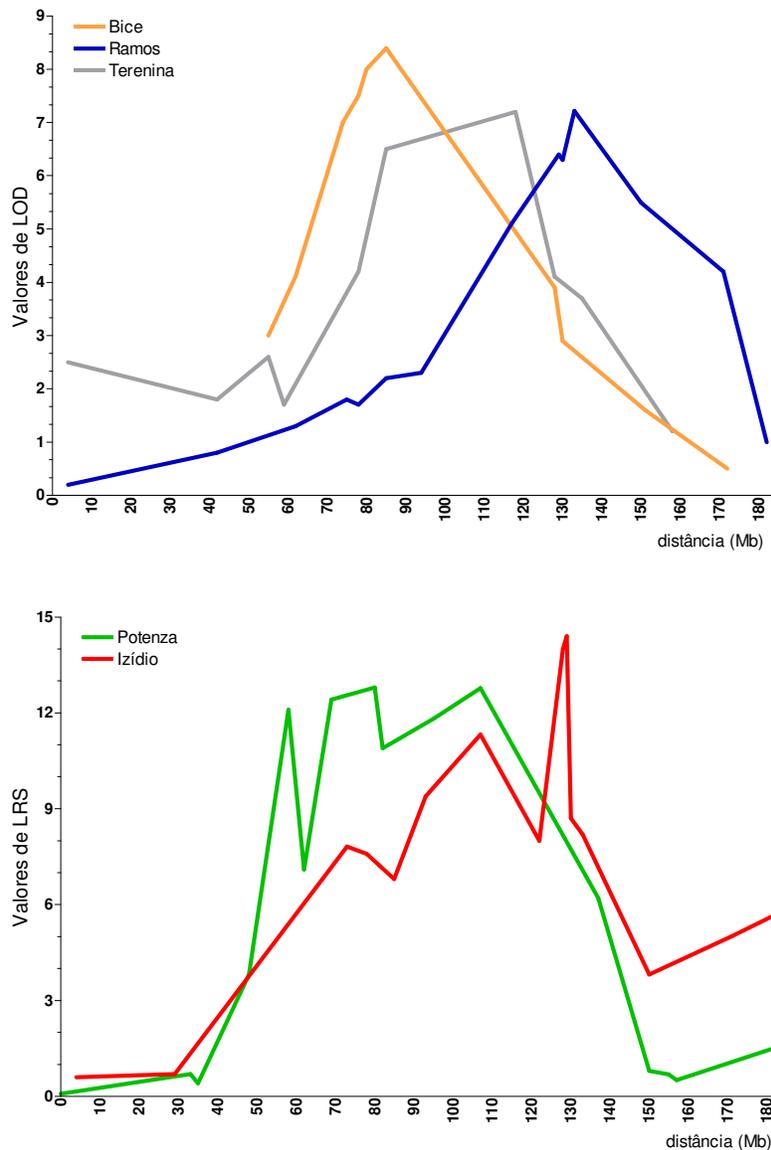
**Figura 12** - Os outros QTL significativos encontrados na análise de ligação, modelo livre, com os 97 machos F2 LEW/SHR para a defecação no CA (a); locomoção no compartimento branco da CBP (b); tempo no compartimento preto da CBP (c) e consumo de etanol forçado 10% (d). Os limiares sugestivos e significativos fornecidos pelo teste de permutação do programa QTX são demonstrados em cada gráfico. OS QTL representados nas letras (b) e (c) estão localizados na mesma região genômica e correspondem, provavelmente, a um único QTL pleiotrópico que influencia três medidas comportamentais na CBP. No eixo x estão representadas as distâncias em centimorgans e no eixo y os valores de LRS.



**Figura 13** – Mapa comparativo dos QTL significativos encontrados na análise de ligação com os 97 machos F2 LEW/SHR (modelo livre) ao longo do cromossomo 4. As linhas vermelha e verde representam QTL encontrados na mesma região genômica que correspondem, provavelmente, a um único QTL pleiotrópico que influencia três medidas comportamentais na CBP. A posição aproximada dos genes candidatos  $\alpha$ -sinucleína e receptor NK1 estão demonstradas no gráfico. Os nomes dos 14 marcadores moleculares utilizados estão colocados no eixo X.

Nas fêmeas, nenhum QTL significativo foi encontrado nesta primeira análise de QTL. Entretanto, ocorreram 10 QTL com efeito sugestivo afetando comportamentos do CA, CBP, TNF e consumo de etanol. Destes, seis foram encontrados no modelo livre, dois no dominante e dois no modelo aditivo (Tabela 9). Três deles aconteceram em medidas que apresentaram significância nos machos (todos no CA): locomoção central (máximo LRS=5,0 entre os marcadores D4MGH27-D4MIT16), locomoção periférica (máximo LRS=5,0 no marcador D4RAT40) e defecação no CA (máximo LRS=5,1 no marcador D4RAT76) (Tabela 9). Além disso, três deles apresentaram efeito pleiotrópico: sobre a locomoção periférica e consumo de etanol 20%; defecação e tempo no centro do CA; defecação no TNF e consumo de etanol 20% (Tabela 9).

A Figura 14 representa a posição aproximada de cinco QTL independentemente mapeados por diferentes autores no cromossomo 4 do rato para: preferência por 10% de etanol nas linhagens P e NP (Bice *et al.*, 1998); locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999); preferência por 5% de etanol nas linhagens HEP e WKY (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b); níveis de corticosterona nas linhagens LEW e F344 (Potenza *et al.*, 2004) e locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR (Izídio, presente estudo). As posições físicas foram estimadas através da comparação dos dados originais da análise de ligação e as coordenadas dos marcadores moleculares utilizados (em pares de bases) a partir do RGD (<http://rgd.mcw.edu/>). Os QTL de Bice *et al.* (1998); Ramos *et al.* (1999) e Terenina-Rigaldie *et al.* (2003b) têm seus dados originais em LOD score e os dois QTL mais recentes têm os seus dados em LRS (Figura 14).



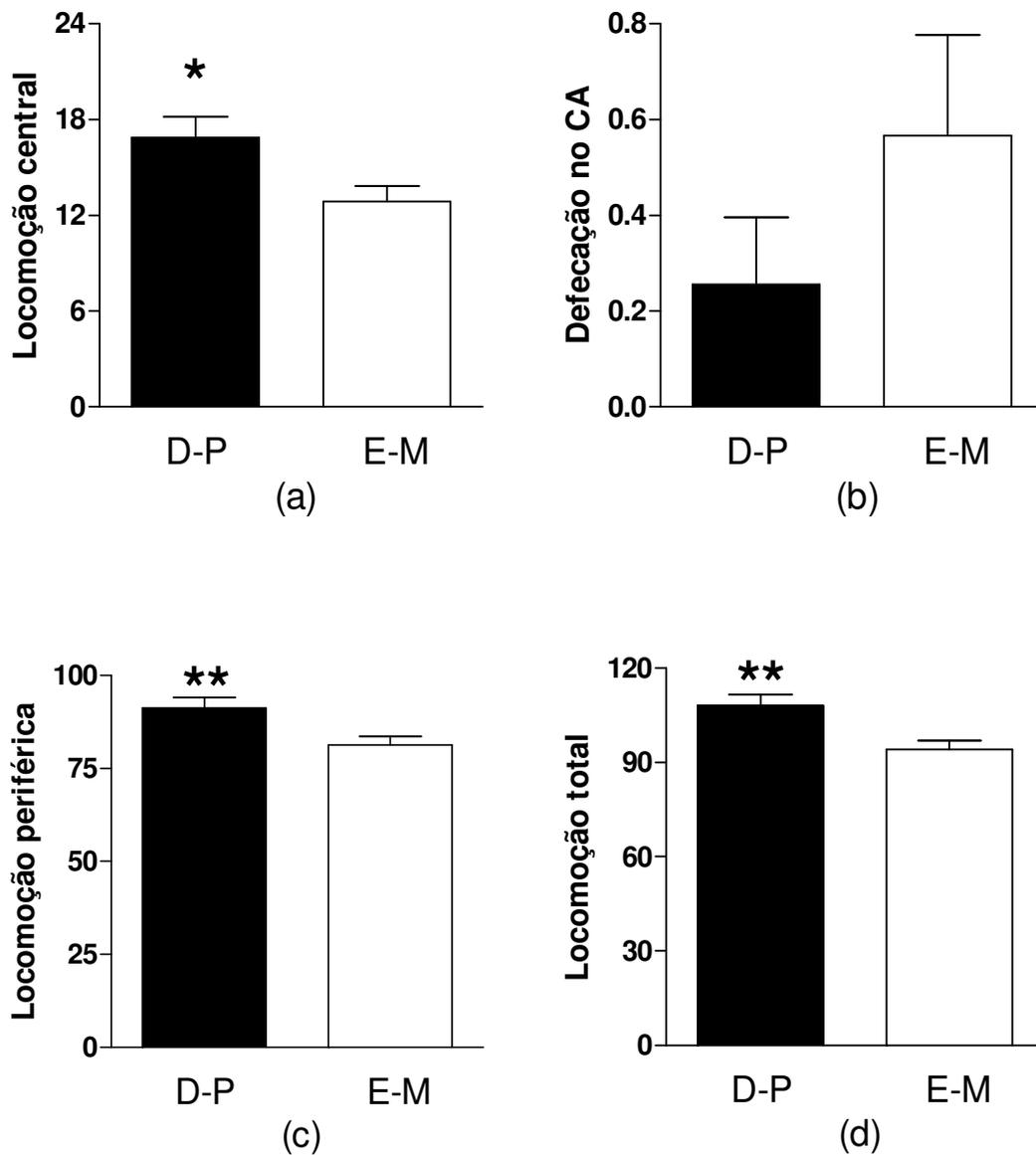
**Figura 14** – Os cinco QTL independentemente mapeados no cromossomo 4 do rato para: preferência por 10% de etanol nas linhagens P e NP (Bice *et al.*, 1998); locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999); preferência por 5% de etanol nas linhagens HEP e WKY (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b) acima; e níveis de corticosterona nas linhagens LEW e F344 (Potenza *et al.*, 2004) e locomoção central no CA nas linhagens LEW e SHR (Izídio, presente estudo) abaixo. Mb = megabases.

Os resultados dos testes do CA com as fêmeas F2 segundo as fases do ciclo estral estão representados na Figura 15. Ocorreu uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na locomoção central do CA, onde as fêmeas no diestro-proestro se mostraram menos “ansiosas” por se aproximarem mais desta área aversiva. Ocorreram também diferenças significativas na locomoção periférica ( $p < 0,01$ ) e locomoção total ( $p < 0,01$ ), onde as fêmeas no diestro-proestro foram as que apresentaram maiores índices de locomoção. Nenhuma diferença significativa ocorreu nos comportamentos do teste da CBP (dados não mostrados).

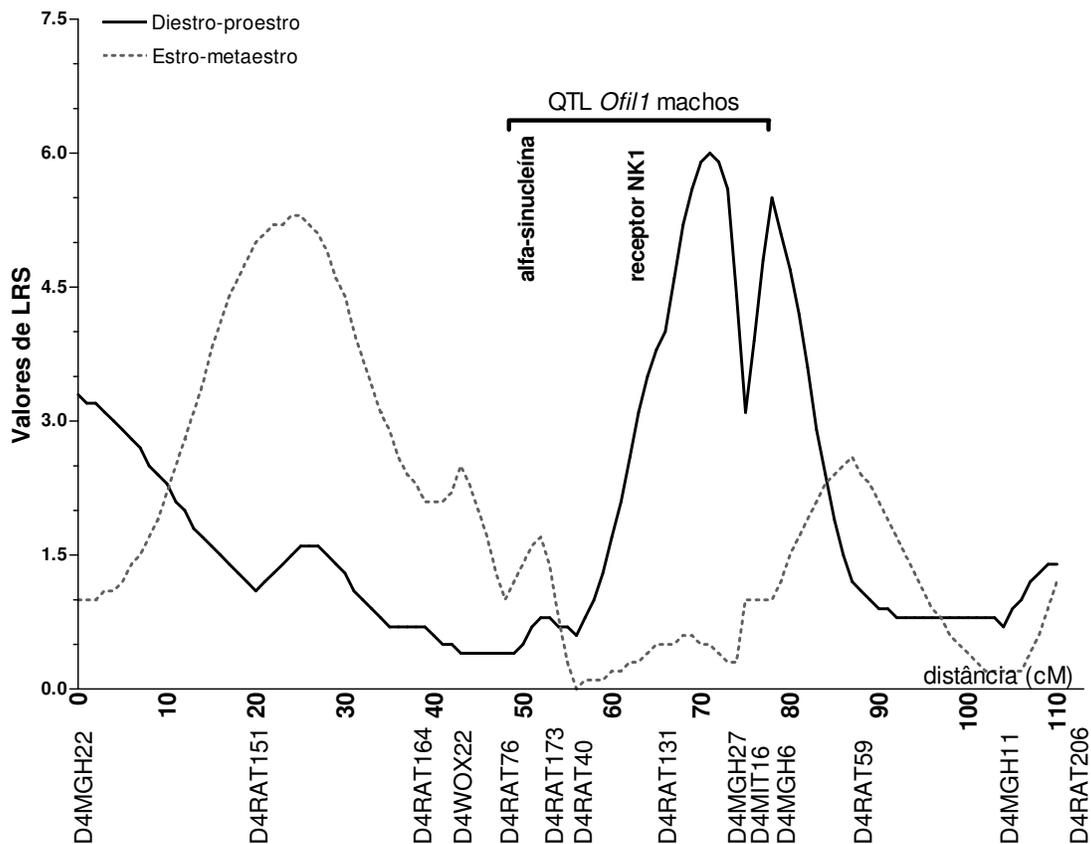
Na análise de ligação com as fêmeas considerando as fases do ciclo estral foram encontrados dois QTL significativos e cinco sugestivos nas fêmeas do diestro-proestro (Tabela 10) e um QTL significativo e quatro sugestivos nas fêmeas do estro-metaestro (Tabela 11). Este QTL significativo encontrado nas fêmeas do estro-metaestro apresentou um efeito pleiotrópico, afetando quatro medidas comportamentais do teste da CBP, sendo que duas delas alcançaram o limiar significativo e duas o limiar sugestivo (Tabela 11). Entre estes, foram encontrados dois QTL sugestivos para a locomoção central no CA. O primeiro, na análise de ligação com as fêmeas no diestro-proestro (máximo LRS=6,0 no marcador D4MGH27, explicando 13% da variância total) e o segundo com as fêmeas no estro-metaestro (máximo LRS=5,3 no marcador D4RAT151, explicando 9% da variância total) ambos no modelo livre (Figura 16).

Em tese, uma análise com maior número de animais F2 poderá fornecer resultados mais fidedignos. Por esta razão, a figura 17 mostra o resultado da análise de ligação para a medida locomoção central no CA com todas as 192 fêmeas deste estudo (96 da primeira e 96 da segunda análise de QTL). Podemos observar que,

somando todas as fêmeas, o QTL para esta medida não alcança o limiar sugestivo ou significativo (LRS máximo de 2,5 próximo ao marcador D4RAT173).



**Figura 15** - Comportamento das fêmeas F2 no teste do CA segundo as diferentes fases do ciclo estral. \* e \*\*  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ; respectivamente (teste-t). D-P = diestro-proestro, N = 43; E-M = estro-metaestro, N = 53.



**Figura 16** - Os dois QTL sugestivos encontrados para a locomoção central no CA na análise de ligação com as 43 fêmeas no diestro-proestro (linha escura) ou com as 53 fêmeas no estro-metaestro (linha picotada). Ambos foram achados utilizando-se o modelo livre. A posição aproximada dos genes candidatos  $\alpha$ -sinucleína e receptor NK1 estão demonstradas no gráfico. Os nomes dos 14 marcadores moleculares utilizados estão colocados no eixo X. O traço em negrito acima das curvas de QTL demonstra o intervalo de confiança de 96.8% do QTL encontrado em machos para a locomoção central no CA.

**Tabela 10** - QTL significativos e sugestivos identificados nas ratas fêmeas no diestro-proestro a partir da análise de ligação com os animais F2.

Fenótipo	Marcador	Localização (cM)	LRS	% variância	F	P	Modelo	L/L	L/S	S/S	Significância
Locomoção Central CA	D4MGH27	71	6,0	13	2,76	0,07528	Livre	20,83±3,21	13,95±1,56	18,20±2,12	Sugestivo
Defecação CA	D4RAT151	12-14	14,3	28	6,21	0,00449	Livre	0,08±0,08	0,08±0,08	1,33±0,84	Significativo
Defecação CA	D4RAT76	48	14,5	14	0,19	0,83076	Livre	0,18±0,13	0,25±0,25	0,40±0,40	Sugestivo
Locomoção periférica CA	D4RAT131	64	8,8	9	3,23	0,04995	Livre	97,75±2,53	83,53±5,19	96,75±5,88	Sugestivo
Tempo no Centro CA	D4MGH11	104	14,3	14	1,31	0,28008	Livre	32,13±3,50	39,59±4,48	29,30±6,50	Sugestivo
Locomoção Total CA	D4MGH11	97	10,4	10	2,06	0,14035	Livre	115,75±3,36	100,29±6,19	109,30±8,26	Sugestivo
Tempo comp. Preto CBP	D4RAT206	110	9,5	20	5,07	0,01087	Livre	248,77±5,63	229,11±5,44	250,73±4,95	Sugestivo
Locomoção comp.preto CBP	D4RAT206	110	9,9	21	5,10	0,01061	Dominante	36,62±2,54	28,74±1,44	28,36±2,29	Significativo
Tempo comp.	D4MGH6	78	5,7	12	2,89	0,06717	Dominante	47,62±6,63	33,38±3,36	34,22±5,37	Sugestivo

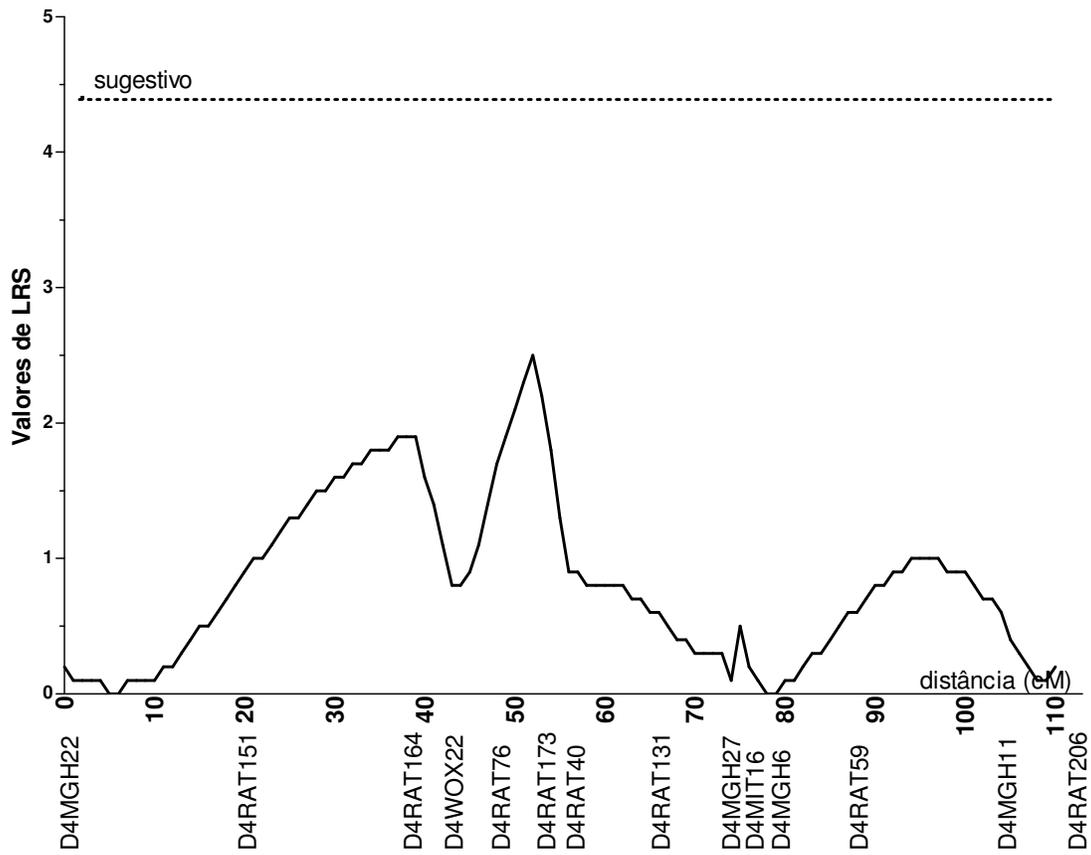
Branco CBP												
Locomoção comp.branco CBP	D4MGH6	77	5,8	13	2,78	0,07428	Livre	19,92±1,81	15,81±1,04	18,89±1,34	Sugestivo	

**Legenda das variáveis:** cM= centimorgan; comp.= compartimento; CA= campo aberto; CBP = caixa branca/preta; LRS= likelihood ratio statistic; L/L, L/S, S/S= genótipos dos animais segundo o marcador utilizado (L = Lewis e S = SHR). No caso do QTL ser encontrado no intervalo entre dois marcadores, os dados do marcador que tem o valor de p mais significativo está mostrado na tabela. Cada cor de linha diferente representa um QTL, ou seja, em casos onde mais de uma linha apresenta a mesma cor o efeito do QTL é considerado como sendo pleiotrópico.

**Tabela 11** - QTL significativos e sugestivos identificados nas ratas fêmeas no estro-metaestro a partir da análise de ligação com os animais F2.

Fenótipo	Marcador	Localização (cM)	LRS	% variância	F	P	Modelo	L/L	L/S	S/S	Significância
Locomoção central CA	D4RAT151	24	5,3	9	2,45	0,09637	Livre	17,56±2,69	11,97±1,31	11,79±1,52	Sugestivo
Locomoção comp.preto CBP	D4RAT151	87	9,7	17	3,97	0,02514	Livre	24,44±2,72	31,20±1,40	26,14±1,73	Sugestivo
Defecação CA	D4RAT76	48	14,5	14	1,94	0,15488	Livre	1,17±0,75	0,18±0,18	0,95±0,47	Sugestivo
Locomoção periférica CA	D4RAT131	64	8,8	9	0,42	0,66021	Livre	80,14±8,47	83,56±2,74	78,91±4,33	Sugestivo
Locomoção total CA	D4RAT59	97	10,4	10	1,41	0,25384	Livre	86,71±10,70	99,04±3,83	91,14±4,08	Sugestivo
Tempo comp.preto CBP	D4RAT206	109	8,9	15	4,18	0,02091	Livre	223,67±7,81	252,96±5,18	238,40±6,80	Sugestivo
Tempo comp. Branco CBP	D4RAT206	110	15,2	25	8,02	0,00095	Livre	55,00±5,89	25,33±3,31	36,60±5,08	Significativo
Locomoção comp.branco CBP	D4RAT206	110	13,3	22	7,35	0,00159	Livre	23,44±1,31	14,38±1,27	16,15±1,48	Significativo
Transições CBP	D4RAT206	110	8,7	15	4,66	0,01397	Livre	4,22±0,32	2,50±0,29	3,10±0,37	Sugestivo

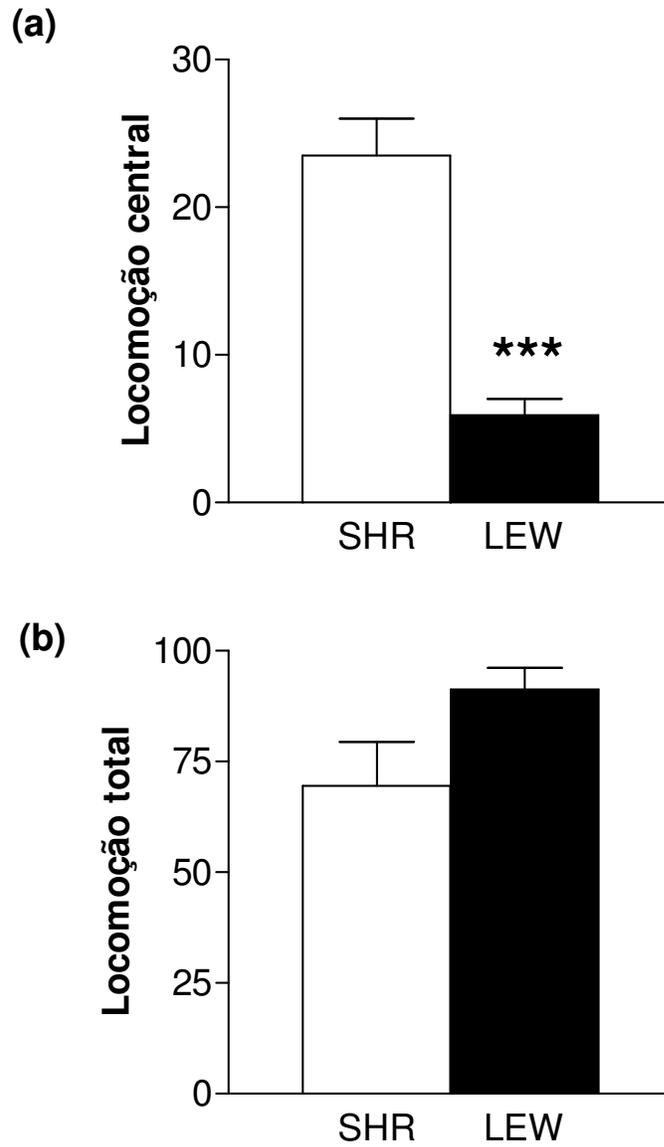
**Legenda das variáveis:** cM= centimorgan; comp.= compartimento; CA= campo aberto; CBP = caixa branca/preta; LRS= likelihood ratio statistic; L/L, L/S, S/S= genótipos dos animais segundo o marcador utilizado (L = Lewis e S = SHR). No caso do QTL ser encontrado no intervalo entre dois marcadores, os dados do marcador que tem o valor de p mais significativo está mostrado na tabela. Cada cor de linha diferente representa um QTL, ou seja, em casos onde mais de uma linha apresenta a mesma cor o efeito do QTL é considerado como sendo pleiotrópico.



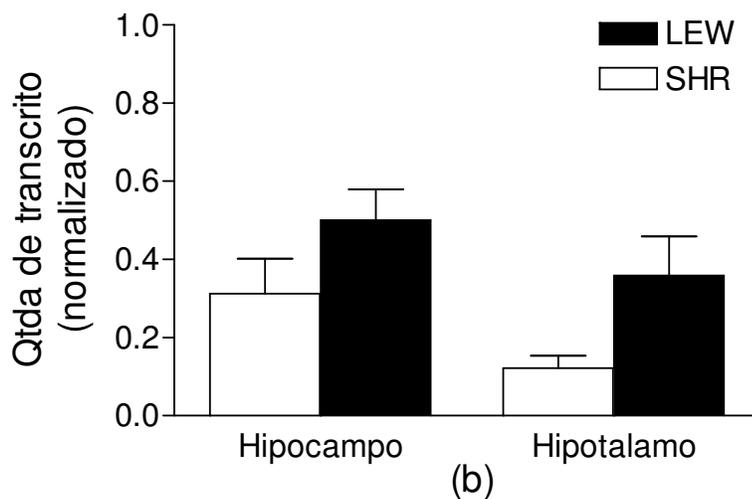
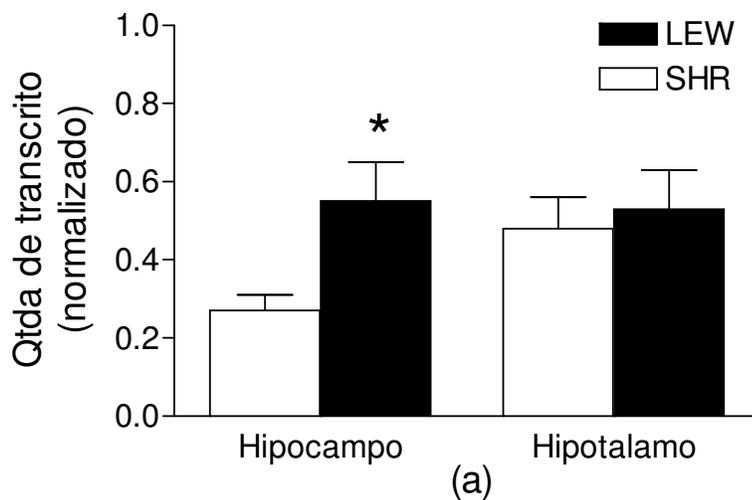
**Figura 17** - A análise de ligação realizada com todas as 192 fêmeas (incluindo as diferentes fases do ciclo estral). Os nomes dos 14 marcadores moleculares utilizados estão colocados no eixo X.

## Segunda estratégia experimental

Paralelamente à análise de QTL, nós investigamos dois genes candidatos potenciais na região cromossômica em estudo que poderiam explicar os efeitos de *Ofil1*. Para isso, primeiramente, os ratos LEW e SHR foram submetidos a um teste do CA, onde os ratos LEW mostraram menor locomoção central ( $p < 0.001$ ) (ou maior ansiedade/emocionalidade) (Figura 18a) e nenhuma diferença quanto à locomoção total ( $p > 0.05$ ) quando comparados com os ratos SHR (Figura 18b). Após isso, os ratos foram sacrificados e tiveram seus cérebros retirados para a avaliação da expressão gênica através de real-time RT-PCR. Os resultados revelaram que, no hipocampo, os ratos LEW mostraram uma maior expressão do gene da  $\alpha$ -sinucleína ( $p < 0.05$ ), medida a partir da quantidade de RNAm transcrito, quando comparados aos ratos SHR (Figura 19a). Já no hipotálamo a concentração do RNAm da  $\alpha$ -sinucleína foi similar em ambas as linhagens (Figura 19a). Nenhuma diferença significativa foi encontrada, no hipocampo ou hipotálamo, na expressão do gene *Tac1r* entre as linhagens LEW e SHR, apesar de haver uma tendência não significativa no hipotálamo (Figura 19b). Estes resultados, em conjunto, sugerem a participação do gene da  $\alpha$ -sinucleína na regulação dos comportamentos relacionados à ansiedade no modelo genético LEW/SHR. Por esta razão, este gene foi escolhido, inicialmente, para dar seqüência à abordagem de gene candidato.

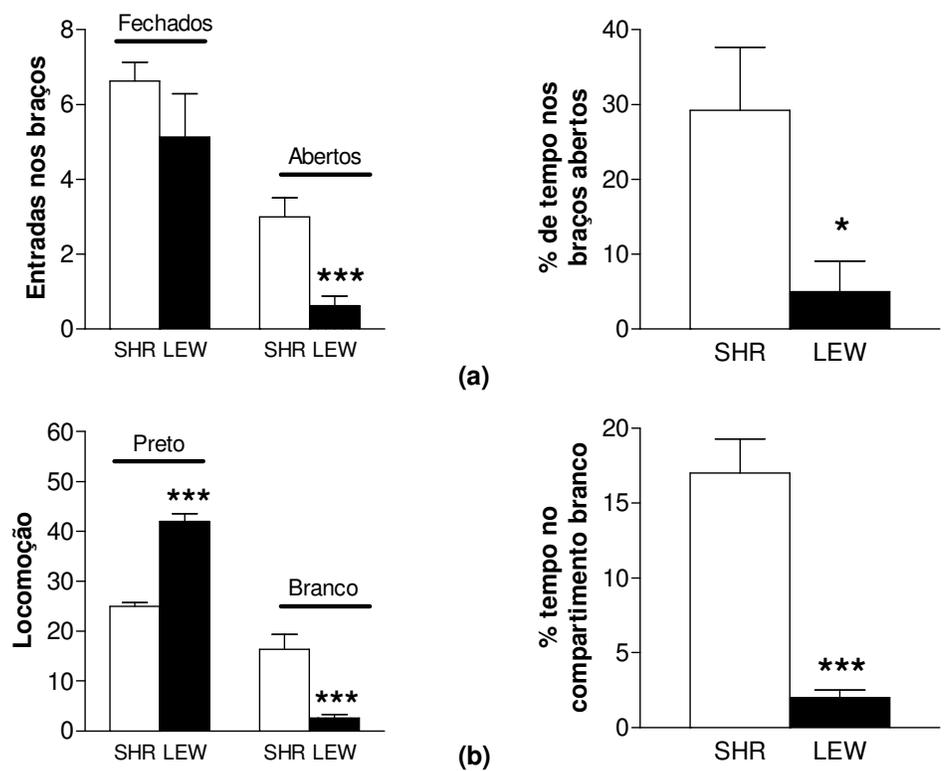


**Figura 18** - Locomoção central (a) e total (b) no campo aberto dos ratos LEW e SHR (n=8/linhagem), \*\*\*  $p < 0.001$ ; teste-t.

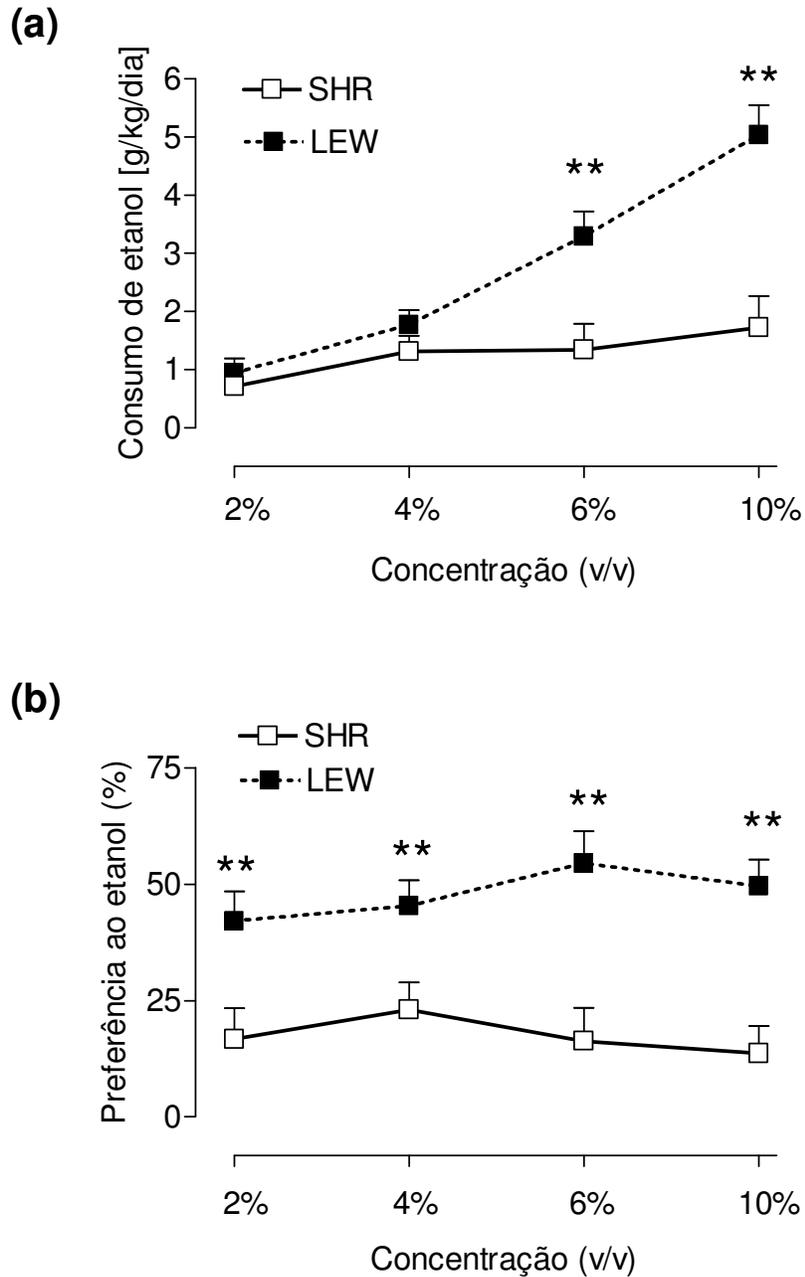


**Figura 19** - Quantidade de RNAm (normalizado em relação ao gene da ciclofilina) do gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína (a) e do gene *Tac1r* do receptor Nk1 (b) no hipocampo e hipotálamo dos ratos LEW e SHR (7-8/linhagem). \*  $p < 0.05$ ; teste-t.

Além destes ratos utilizados no CA, outros ratos LEW e SHR machos foram usados nos testes do LCE e CBP. Os ratos LEW mostraram menor número de entradas e % de tempo gasto nos braços abertos do LCE ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ; respectivamente) em relação aos ratos SHR (Figura 20a). Entretanto, o número de entradas nos braços fechados não diferiu entre as linhagens ( $p > 0,05$ ) (Figura 20a). A locomoção e a % de tempo no compartimento branco da CBP dos ratos LEW foi reduzida quando comparada aos ratos SHR ( $p < 0,001$  para ambas) (Figura 20b). Neste mesmo sentido, a locomoção no compartimento preto foi maior nos animais LEW ( $p < 0,001$ ) em comparação aos animais SHR (Figura 20b). Nos três testes comportamentais de ansiedade, os ratos LEW evitaram mais as áreas aversivas do que os ratos SHR. Em seguida, nós avaliamos os ratos LEW e SHR em um protocolo de consumo de etanol e substâncias controles. Nenhuma diferença entre ratos machos LEW e SHR foi observada no consumo de sacarina e quinino em livre escolha; de etanol forçado (10%) (dados não mostrados), ou de etanol a 2% e 4% em livre escolha ( $p > 0,05$ ) (Figura 21a). Porém, os ratos LEW ingeriram mais etanol do que os SHR, quando este foi oferecido em livre escolha nas concentrações de 6% ( $p < 0,01$ ) e 10% ( $p < 0,01$ ) (Figura 21a). Os animais LEW e SHR diferiram também na preferência ao etanol em todas as concentrações ( $p < 0,01$ ), com a diferença tendo o mesmo sentido dos dados de consumo absoluto (Figura 21b).



**Figura 20** - Entradas nos braços (fechados e abertos) e porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE (a) Locomoção em ambos os compartimentos (branco e preto) e porcentagem de tempo gasto no compartimento branco (b) (n=8/linhagem), \* p<0,05; \*\*\* p<0,001; teste-t.

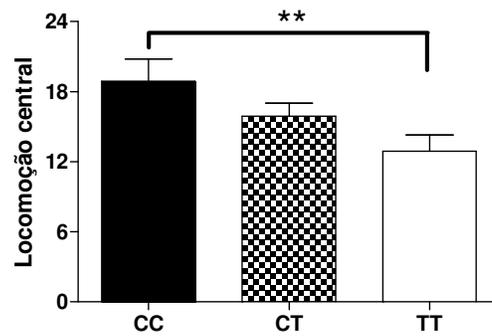


**Figura 21** - Consumo (g/kg/dia) (a) e preferência (b) de etanol oferecido como livre-escolha com água nas concentrações de 2, 4, 6 e 10% (11/linhagem), \*\*  $p < 0,01$  ANOVA de medidas repetidas seguido pelo post hoc de Duncan.

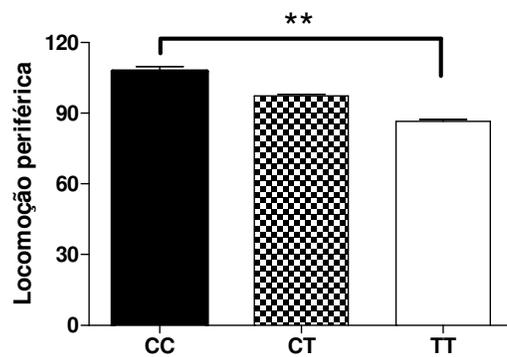
A possibilidade de que diferenças na seqüência do gene *Snca* poderiam ser responsáveis pelas diferenças encontradas na expressão de RNAm da  $\alpha$ -sinucleína e no comportamento entre os ratos LEW e SHR foi investigada em outro experimento. Desta maneira, uma população segregante de machos F2 LEW/SHR, a mesma utilizada na primeira estratégia experimental, foi testada no CA, na CBP, no TNF e em um teste de consumo de etanol, como já descrito anteriormente. Após isto, estes animais foram genotipados para um SNP (*single nucleotide polymorphism*) identificado para ratos LEW e SHR na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína na região 3'-UTR. É importante ressaltar que este SNP foi descoberto no estudo de Chiavegatto *et al.* (2008). Nesta posição, os ratos LEW apresentam naturalmente um nucleotídeo com a base nitrogenada "C", enquanto que os ratos SHR apresentam a base "T". Estudos *in vitro* mostraram que este SNP alterou a eficiência de expressão de um gene repórter em células PC12 de ratos, com o constructo que continha um C na posição +562 (como nos ratos LEW) quase dobrando a expressão *in vitro* (Chiavegatto *et al.*, 2008).

Os resultados da locomoção central para os três possíveis genótipos foram:  $18,9 \pm 1,9$  CC (n=13);  $15,9 \pm 1,1$  CT (n=36); e  $12,9 \pm 1,4$  TT (n=24). A ANOVA revelou um efeito significativo de genótipo ( $F=3,38$ ;  $p<0,05$ ) com o teste post hoc de Duncan mostrando que os ratos que carregam duas cópias do alelo contendo o nucleotídeo C, apresentaram maiores níveis de locomoção central do que os ratos contendo duas cópias do alelo T ( $p<0,01$ ) (Figura 22a). Estes dados confirmam o efeito do alelo proveniente dos animais LEW sobre o aumento na locomoção central no CA. Além disto, os animais com o genótipo CC apresentaram maiores índices de locomoção periférica do que os com o

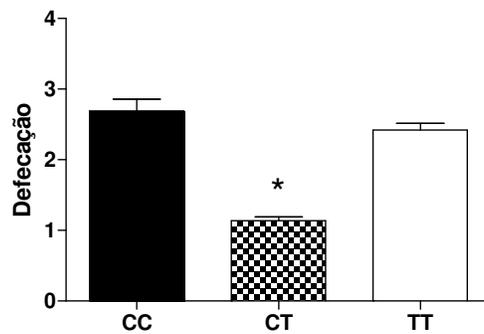
genótipo TT ( $p < 0,01$ ) e os animais com o genótipo CT menor defecação no CA em comparação com os outros genótipos ( $p < 0,05$ ) (Figura 22 b-c). Nenhum efeito de genótipo para as medidas da CBP, do TNF, ou de consumo/preferência ao etanol foram encontrados ( $p > 0,05$ ) (dados não mostrados).



(a)



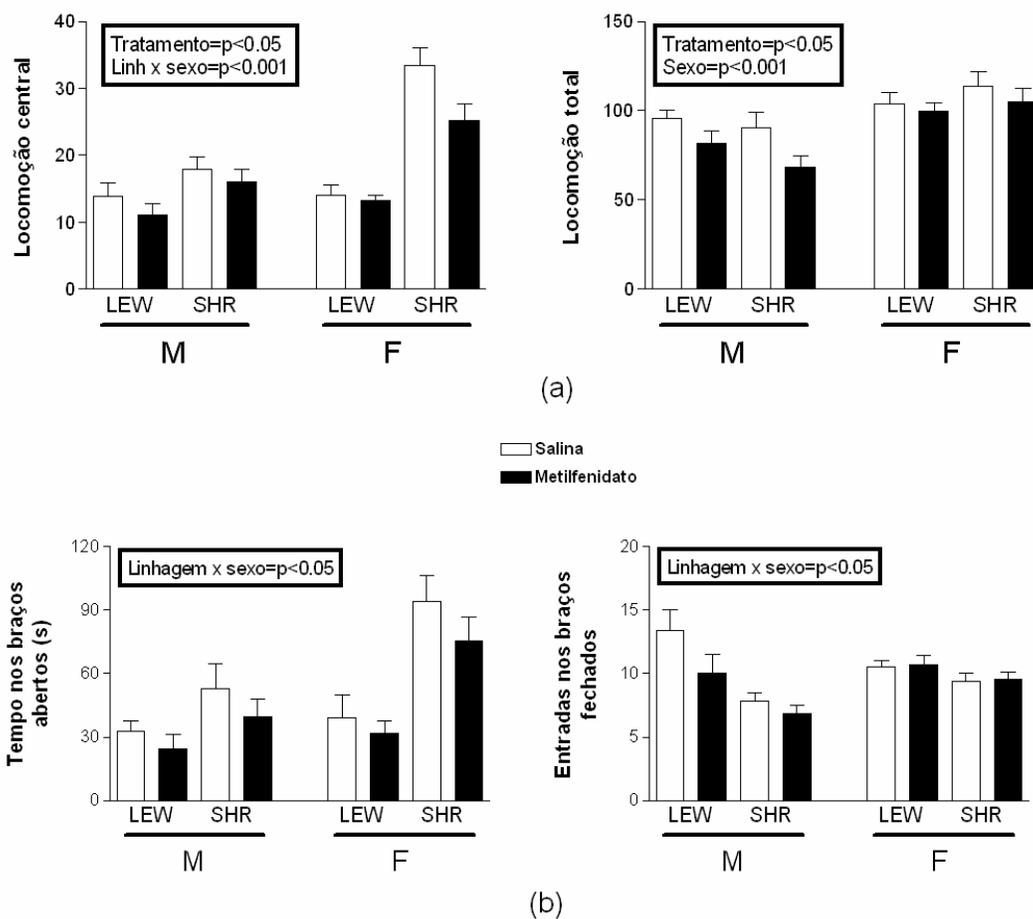
(b)



(c)

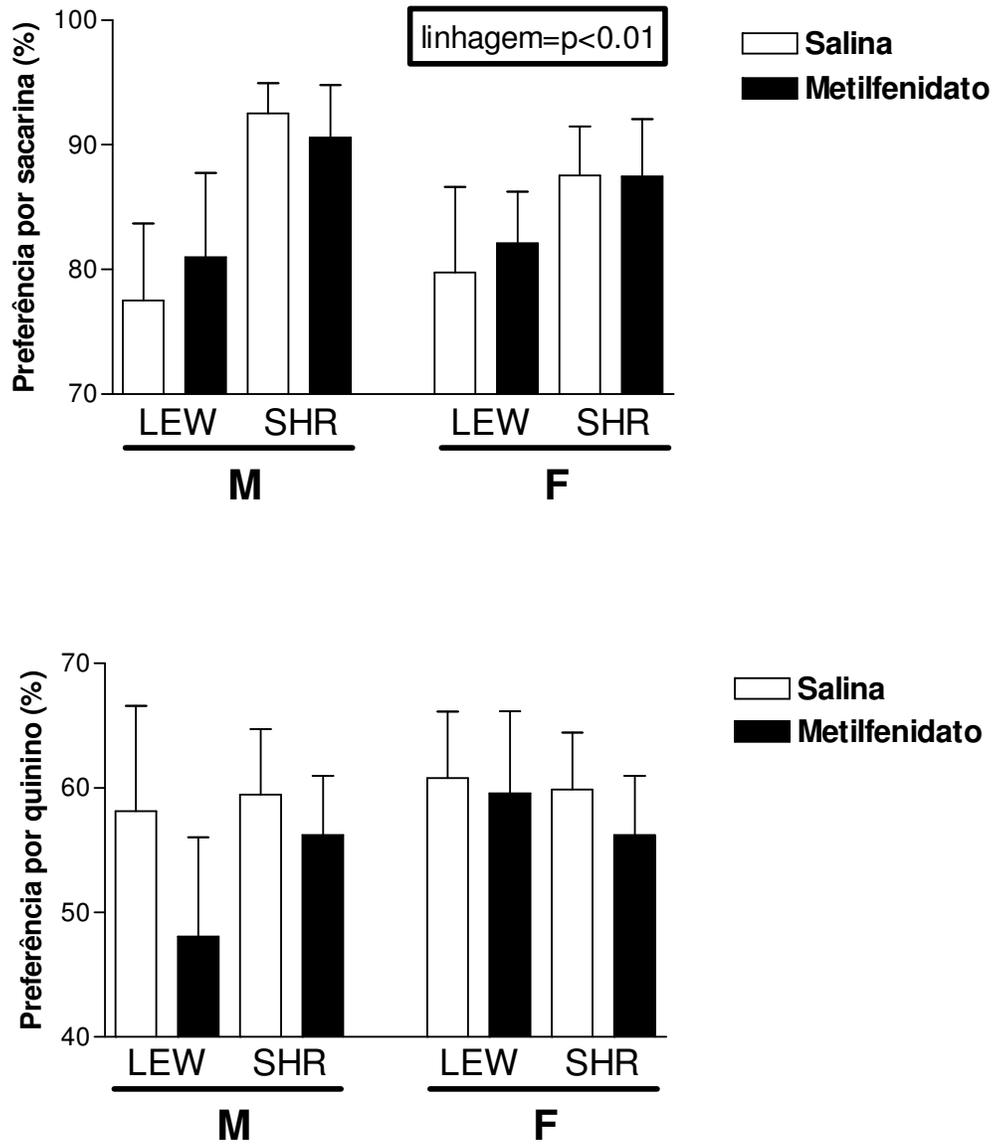
**Figura 22** - Locomoção central (a), \*\* =  $p < 0,01$  CC em relação a TT. Locomoção periférica (b), \*\* =  $p < 0,01$  CC em relação a TT. Defecação no CA (c), \* =  $p < 0,05$  CT em relação aos outros genótipos. CC, CT e TT são os genótipos possíveis dos ratos machos F2 no SNP encontrado na posição +562 do gene da  $\alpha$ -sinucleína. ANOVA seguido pelo *post hoc* de Duncan. (n=13 CC; 36 CT; 24 TT).

Por fim, ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram submetidos a um tratamento com o psicoestimulante MFD durante 16 dias seguidos no período da adolescência (23-38 dias de idade) e testados com 9-10 semanas de idade. Os resultados mostraram que o tratamento reduziu a locomoção central ( $F=5,20$ ;  $p<0,05$ ) e total no CA ( $F=5,93$ ;  $p<0,05$ ), em ambas as linhagens e sexos (Figura 23a). O fator sexo foi significativo na medida locomoção total no CA ( $F=17,83$ ;  $p<0,001$ ). Além disso, ocorreram interações entre os fatores linhagem e sexo nas medidas: locomoção central no CA ( $F=14,14$ ;  $p<0,001$ ) e tempo nos braços abertos do LCE ( $F=5,30$ ;  $p<0,05$ ), com o teste *post hoc* de Duncan mostrando que as fêmeas SHR apresentaram maiores níveis de locomoção e tempo gasto do que todos os outros grupos; e entradas nos braços fechados do LCE ( $F=6,27$ ;  $p<0,05$ ), com o teste *post hoc* de Duncan mostrando que os machos SHR fizeram menos entradas do que todos os outros grupos (Figura 23b). Houve também uma tendência ansiogênica da droga no LCE ( $p=0,08$ ), mostrando que o tratamento pode ser efetivo na redução do tempo de permanência nos braços abertos (Figura 23b). Entretanto, este ponto terá que ser avaliado novamente em experimentos futuros.

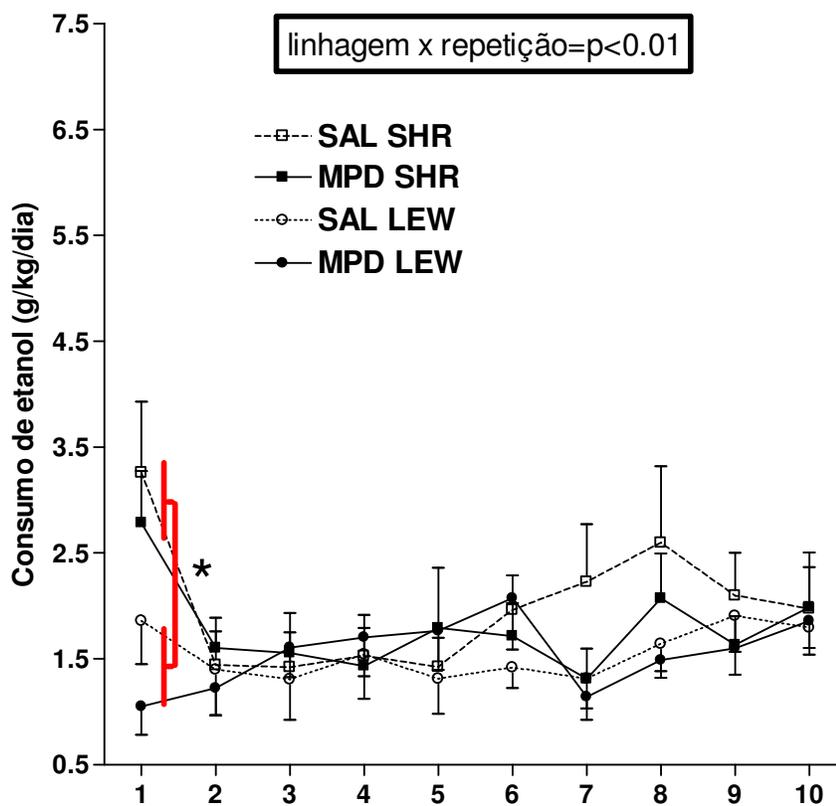


**Figura 23** - Locomoção central e total (a) no CA; tempo nos braços abertos e entradas nos braços fechados do LCE (b) nos animais machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR tratados com salina ou metilfenidato. (ANOVA 3-vias).

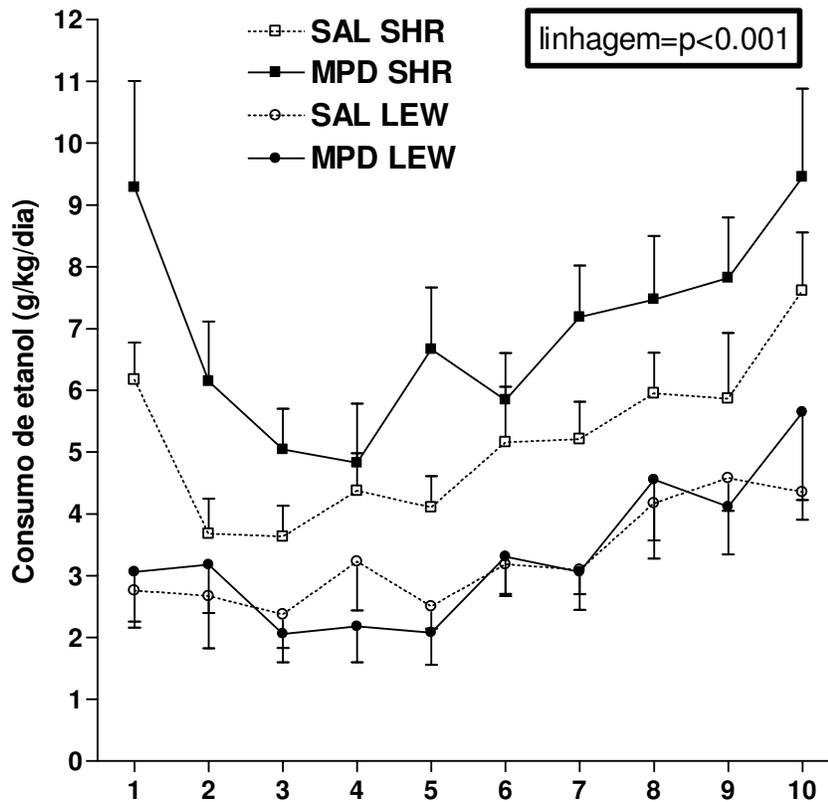
Para a preferência por sacarina, ocorreu um efeito do fator linhagem ( $F=8,67$ ;  $p<0,01$ ), mostrando que os ratos SHR preferem mais esta substância que os ratos LEW, independentemente do sexo avaliado (Figura 24). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na preferência por quinino (Figura 24). Por fim, no consumo de etanol (10%) em machos ocorreu uma interação linhagem x repetição ( $F=3,06$ ;  $p<0,01$ ), com o teste *post hoc* de Duncan mostrando que os machos SHR consumiram mais etanol do que os LEW somente no primeiro bloco de 2 dias (Figura 25). Em fêmeas, ocorreu um efeito geral da repetição ( $F=10,46$ ;  $p<0,001$ ), com o teste *post hoc* de Duncan mostrando que as fêmeas consumiram mais etanol no último bloco, independentemente da linhagem (Figura 26). Também ocorreu um efeito geral de linhagem ( $F=21,52$ ;  $p<0,001$ ), mostrando que as fêmeas SHR consumiram mais etanol do que as fêmeas LEW em todos os blocos experimentais (Figura 26).



**Figura 24** - Preferência por sacarina (acima) ou quinino (abaixo) nos animais machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR tratados com salina ou metilfenidato. (ANOVA 3-vias).



**Figura 25** - Ingestão de etanol 10%, em machos Lewis e SHR tratados com salina ou metilfenidato, oferecido como livre-escolha com água (ANOVA de 3 vias de medidas repetidas).



**Figura 26** - Ingestão de etanol 10%, em fêmeas Lewis e SHR tratadas com salina ou metilfenidato, oferecido como livre-escolha com água (ANOVA de 3 vias de medidas repetidas).

## 5-DISCUSSÃO

No presente trabalho, os ratos da linhagem LEW exibiram maiores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão, pois eles exploraram menos a área central do CA, os braços abertos do LCE, o compartimento luminoso da CBP e apresentaram maior imobilidade no TNF, quando comparados com os ratos SHR (Tabela 2; Figura 9). Estas diferenças são condizentes com dados prévios publicados na literatura (Ramos e Mormède, 1998; Izídio *et al.*, 2005a; Hinojosa *et al.*, 2006), demonstrando que as diferenças fenotípicas entre estas linhagens são robustas e até mesmo observadas em diferentes laboratórios e condições ambientais (Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2002; Vendruscolo *et al.*, 2006; Chiavegatto *et al.*, 2008), o que faz deste par de linhagens uma importante ferramenta no estudo genético da emocionalidade. Entretanto, alguns estudos já encontraram fatores ambientais importantes que podem modificar ou anular a diferença comportamental entre as linhagens LEW e SHR, sugerindo que o ambiente, assim como os genes, apresenta um papel importante na gênese destas diferenças (Izídio *et al.*, 2005b). Do mesmo modo, estudos realizados com estas linhagens, no campo de pesquisa do consumo de etanol, sugerem que os resultados de consumo desta droga parecem ser dependentes de diferentes fatores ambientais (Da Silva *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2005; Vendruscolo *et al.*, 2006; Chiavegatto *et al.*, 2008). Assim, se por um lado o modelo genético LEW/SHR possui grande utilidade na busca direta por genes que influenciam comportamentos relacionados à emocionalidade, ele pode também ser útil na busca de genes que interagem com o ambiente afetando comportamentos

relacionados à ansiedade e à ingestão de etanol. Por este motivo, as linhagens LEW e SHR foram utilizadas neste estudo, que é composto basicamente de duas estratégias paralelas.

Na primeira delas, algumas técnicas genéticas e comportamentais foram empregadas no intuito de descobrir e/ou confirmar regiões genômicas associadas aos comportamentos exibidos no CA, CBP, TNF e consumo de etanol. Na segunda, alguns genes candidatos foram escolhidos com a intenção de se encurtar o longo caminho entre a identificação de uma região genômica importante e a descoberta do (s) gene (s) propriamente dito (s). Buscando facilitar a interpretação dos dados, a discussão estará dividida entre estas duas estratégias experimentais.

### *5.1 Primeira estratégia experimental*

Nós produzimos, simultaneamente, quatro grupos genotípicos de animais (LEW, SHR, F1 e F2) de ambos os sexos que foram testados em 3 diferentes testes comportamentais (CA, CBP, TNF), permitindo que se calculasse a herdabilidade dos fenótipos exibidos (Tabela 3). Estes valores de herdabilidade foram mais altos em machos do que em fêmeas. No estudo de características quantitativas, uma das principais funções do cálculo da herdabilidade é seu caráter preditivo. Entretanto, além do genótipo e de suas interações epistáticas, a expressão de um fenótipo é dependente do ambiente e da sua interação com o genótipo (Hunter, 2005; Caspi e Moffitt, 2006; Meyer-Lindenberg e Weinberger, 2006). Assim, os valores mais altos de herdabilidade em machos podem indicar que eles sofrem menos efeitos “ambientais” (reatividade ao estresse, flutuações hormonais) sendo, portanto, mais

homogêneos do que as fêmeas, o que parece ser senso comum entre a maioria dos pesquisadores. A maioria dos valores de herdabilidade ultrapassou o valor de 0,5. Ou seja, os dados sugerem que mais de 50% da variabilidade total existente nestas características comportamentais, ligadas à ansiedade e à depressão, são influenciadas por fatores genéticos nas populações utilizadas. Este dado reforça a importância dos genes na expressão dos comportamentos relacionados à emocionalidade (Ramos e Mormède, 1998; Clément *et al.*, 2002; Leonardo e Hen, 2006). Dentre todas as medidas, a locomoção central e o tempo de imobilidade no TNF foram as variáveis que apresentaram os maiores valores de herdabilidade (Tabela 3). Este resultado está de acordo com Ramos *et al.* (1998) que, no estudo prévio com as linhagens LEW e SHR de origem francesa, sugeriram a locomoção central como a medida comportamental mais herdável (59%). É importante ressaltar, entretanto, que mesmo em medidas comportamentais do CA, nem sempre valores altos de herdabilidade são encontrados (Flint *et al.*, 1995), ressaltando que os dados não devem ser generalizados, pois eles dependem das condições ambientais presentes no momento dos experimentos bem como dos genótipos envolvidos. Considerando que estes fenótipos são características quantitativas e, portanto, dependentes do efeito de múltiplos genes, uma herdabilidade de 50 % pode ser considerada um valor alto, usualmente encontrado somente em estudos envolvendo características morfológicas (Crusio, 2004). Portanto, as análises posteriores de QTL deveriam fornecer resultados significativos, principalmente para a locomoção central no teste do CA e para o tempo de imobilidade no TNF.

Uma hipótese inicial deste trabalho era que os testes comportamentais, bem como suas inter-relações, não apresentariam os mesmos significados psicológicos entre os sexos. Alguns dados obtidos e comentados nos parágrafos anteriores desta discussão sugeriram que esta hipótese pode ser verdadeira. Mas, com o intuito de dissecar os diferentes componentes emocionais envolvidos nos testes comportamentais e elucidar melhor esta questão, nós utilizamos alguns métodos estatísticos. Assim, os mesmos animais da geração F2 foram testados no CA, CBP e TNF e em um protocolo de consumo de etanol. Após a finalização desta bateria de testes, algumas medidas comportamentais (duas a três de cada teste mais cinco do consumo de etanol) originadas com estes animais F2 foram utilizadas para a produção de uma matriz de correlação e posterior ACP (Tabelas 4-7), separadamente para cada sexo.

Os resultados da matriz revelaram algumas correlações intra e inter-testes significativas que podem ser ressaltadas. Por exemplo, em ambos os sexos, a locomoção central se correlacionou positivamente com a locomoção periférica no CA (Tabela 4-5). Este resultado, a princípio, pode parecer surpreendente, pois estas medidas deveriam medir componentes emocionais diferentes (Fernández-Teruel *et al.*, 2002). Contudo, resultados prévios da literatura também sugerem que estas duas medidas podem compartilhar significados psicológicos comuns, pois, afinal, ambas envolvem locomoção e são coletadas quando o animal está sendo exposto a um ambiente inédito, que deve provocar reações emocionais. Os ratos Floripa H e L, que foram selecionados bidirecionalmente em nosso laboratório para a locomoção central no CA, após 4 gerações apresentavam divergência também em relação à

locomoção periférica (Ramos *et al.*, 2003). Outro ponto interessante a ser comentado é que, originalmente, no CA somente se mensurava a locomoção total dos animais (Hall, 1934). Como o ambiente do teste era inédito ao animal, aquele que se locomovesse menos e defecasse mais era considerado o animal mais “ansioso”. Parecia, portanto, que a locomoção geral no aparato era influenciada por fatores emocionais, independentemente da região onde o rato estivesse. Muitos anos depois, algumas evidências, principalmente farmacológicas, começaram a sugerir que poderia existir uma distinção entre os significados da locomoção central e periférica (para revisão ver Prut e Belzung, 2003). Não é nossa intenção dizer que um único comportamento seja uma medida pura de emocionalidade, pois assim como uma medida dita emocional pode depender, entre outras coisas, da locomoção, a locomoção também pode ser influenciada por diversos fatores motivacionais (Paulus e Geyer, 1993). Mas, a tentativa de se separar as locomoções central e periférica vai ao encontro da complexidade neurobiológica que rege estes comportamentos e que pode nos levar, no futuro, a uma melhor compreensão do significado real dos testes comportamentais. Entretanto, nossos dados reforçam que, ao menos em parte e ao menos nestas populações, estas locomoções têm um componente biológico e genético comum. As demais correlações intra-testes foram mais ou menos óbvias, pois aconteceram entre medidas que já têm, naturalmente, uma grande relação devido a fatores físicos (tempo no compartimento branco com o tempo no preto) ou biológicos (consumo de etanol 2,5% com o de 5%).

Em relação às correlações encontradas entre diferentes testes, as correlações positivas entre a locomoção central e periférica no CA com a

locomoção no compartimento branco da CBP foram comuns aos animais de ambos os sexos (Tabela 4-5). Assim como no CA, onde os animais que se aproximam mais da área central e aversiva podem ser considerados os menos ansiosos, na CBP, a aproximação do ambiente claro é considerada um índice de baixa “ansiedade” (Crawley, 1981; Costall *et al.*, 1989). Como estes dois testes comportamentais são baseados na esquivas de áreas aversivas, é razoável pensar que eles devem medir, ao menos em parte, uma mesma dimensão emocional. De fato, uma grande quantidade de dados comportamentais (Ramos *et al.*, 1998; 2002; Izídio *et al.*, 2005b) farmacológicos (Chauloff *et al.*, 1997; Prut e Belzung, 2003) e genéticos (Ramos *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2006) sugerem que o CA e a CBP podem medir a mesma dimensão emocional. No entanto, quando os animais são testados simultaneamente nestes dois aparatos, drogas ansiogênicas aumentam a esquivas das áreas aversivas de ambos os testes, mas, ao contrário, drogas ansiolíticas não apresentam efeito semelhante em ambos os testes (Ramos *et al.*, 2008). Ramos (2008) sugere que a estimativa da variabilidade total compartilhada entre o CA e a CBP é de apenas 5,3%. Ou seja, mesmo entre testes que supostamente deveriam medir comportamentos relacionados à ansiedade, existem grandes diferenças que podem significar que cada teste mede, em grande parte, uma dimensão emocional diferente (Archer, 1973; Ramos e Mormède, 1998).

Outras correlações interessantes ocorreram entre medidas da CBP e do TNF com consumo de etanol, somente em machos (Tabela 4). A correlação positiva aqui encontrada entre comportamentos relacionados à baixa ansiedade e ao alto consumo de etanol vai contra o exposto em parte da

literatura, pois os animais mais “ansiosos” deveriam ser os que consomem maiores quantidades de etanol (Colombo *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1995; Möller *et al.*, 1997; Pandey, 2003; Pandey *et al.*, 2005). Entretanto, este ponto é controverso e os resultados não são conclusivos (Tuominen *et al.*, 1990; Viglinskaya *et al.*, 1995; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Vendruscolo *et al.*, 2006; Izídio e Ramos, 2007). Porém, os animais mais imóveis no TNF foram os que consumiram maiores quantidades de etanol, apoiando a hipótese de comorbidade clínica entre alcoolismo e depressão (Nurnberger *et al.*, 2004; Quello *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2008) e relacionando comportamentos de estresse com o consumo de etanol.

A ACP, assim como a matriz de correlação, foi realizada separadamente para machos e fêmeas, com o intuito de se investigar se os testes e suas relações apresentam os mesmos significados psicológicos entre os sexos (Tabelas 6-7). O objetivo de uma ACP é utilizar as correlações entre muitas variáveis originais, criando um pequeno número de índices virtuais (fatores) que não são correlacionados entre si e explicam, portanto, diferentes dimensões contidas nos dados originais (Manly, 1988). Ambas as análises revelaram cinco fatores principais com limiar (*eigenvalues*) maior do que 1, porém com diferenças importantes entre os sexos. Na ACP para as 13 medidas comportamentais dos quatro diferentes testes realizados com os animais machos F2, os cinco fatores representaram 72% da variabilidade total (Tabela 6). O fator 1, que representa a maior fatia da variabilidade total, está associado principalmente com medidas relacionadas à ansiedade na CBP. O fator 2 é representativo das medidas de consumo de etanol. O fator 3 representa as medidas relacionadas à ansiedade do CA. O fator 4 representa um misto entre

o teste de “depressão” juntamente com o consumo de etanol forçado e de etanol em livre escolha (2,5%) e, finalmente, o fator 5, que contribui com menos de 10% da variabilidade total, é representado pela defecação no TNF. Os resultados aqui encontrados apóiam a idéia de que o complexo conjunto de comportamentos ligados à ansiedade/emocionalidade varia ao longo de duas ou mais dimensões independentes (Archer, 1973; File, 1991; Cruz *et al.*, 1994; Ramos e Mormède, 1998), pois as medidas do CA e da CBP ficaram em fatores diferentes. Além disso, múltiplos testes de emocionalidade (cada um deles com seus particulares contextos aversivos), quando aplicados aos mesmos grupos de animais, linhagens ou tratamentos farmacológicos, freqüentemente produzem resultados conflitantes, indicando que cada teste individual parece de fato se relacionar a uma dimensão distinta da reatividade emocional (Archer, 1973; File, 1991; Trullas e Skolnick, 1993; Ramos e Mormède, 1998). Dados recentes de nosso laboratório corroboram esta hipótese, de que o CA e a CBP podem medir comportamentos emocionais bastante distintos (Ramos, 2008).

Já em fêmeas, os cinco fatores encontrados após a ACP representaram 67% da variabilidade total (Tabela 7). O fator 1, que representa a maior fatia da variabilidade total, está associado principalmente com medidas relacionadas à ansiedade no CA e na CBP. O fator 2 representa medidas de consumo de etanol, assim como o fator 3. Entretanto, o fator 2 representa a ingestão das maiores concentrações, enquanto que o fator 3 tem as medidas de consumo de etanol nas concentrações mais baixas, juntamente com a defecação no TNF e o consumo de etanol forçado. Por fim, o fator 4 representa uma relação do CA com o tempo de imobilidade no TNF e o fator 5, a defecação no CA.

Contrariamente ao encontrado em machos, os resultados da ACP em fêmeas mostraram um fator misto entre medidas do CA e da CBP. Estes resultados apontam para um significado psicológico distinto entre os dois sexos para os mesmos testes comportamentais. Resultados semelhantes já foram encontrados na literatura (Johnston e File, 1991; Kelly *et al.*, 1999; Palanza, 2001; Beck e Luine, 2002). Além disso, as medidas de consumo de etanol dividiram-se em dois fatores em fêmeas. Recentemente, tem sido sugerido que fêmeas podem ser um modelo interessante na busca de regiões genômicas que influenciam os comportamentos relacionados ao alcoolismo (Vendruscolo *et al.*, 2006a). Assim, diferenças na ingestão de diferentes concentrações de etanol podem depender de genes ou mecanismos biológicos diferentes nos animais deste sexo. O fator 4, de maneira interessante, replica um resultado já previamente encontrado por nosso grupo (Hinojosa *et al.*, 2006), relacionando comportamentos do CA com o TNF, onde o animal que evita mais o centro do CA é o que permanece mais tempo imóvel no TNF. Assim, nossa hipótese de que os testes e suas relações não apresentariam os mesmos significados psicológicos entre os dois sexos, pode ser parcialmente confirmada, pois diferenças importantes na análise da matriz de correlação e na ACP foram encontradas entre eles, com as fêmeas revelando um maior grau de semelhança entre testes de emocionalidade (como o CA, a CBP e o TNF) do que os machos.

Nossa segunda hipótese era que o QTL *Ofil1* estaria presente ao menos em fêmeas F2 LEW/SHR e, possivelmente, também em machos derivados das sub-linhagens brasileiras, pois no trabalho de Ramos *et al.* (1999), este *locus* afetava fêmeas derivadas de sub-linhagens LEW e SHR francesas. A primeira

análise de QTL realizada no presente estudo revelou cinco regiões cromossômicas significativamente associadas com comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade e ao consumo de etanol. Mas este resultado foi encontrado somente em machos, o que não corrobora totalmente nossa hipótese inicial. A Tabela 8 demonstra que estas regiões afetam: a locomoção central e a defecação no CA; a locomoção no compartimento branco e o tempo no compartimento preto da CBP e o consumo de etanol forçado, todos no modelo livre. No modelo aditivo, a locomoção periférica no CA e no modelo dominante o tempo no compartimento branco da CBP também forneceram QTL significativos. Destes todos, os três QTL mais significativos foram encontrados no teste do CA e da CBP utilizando-se o modelo livre e, com exceção daquele encontrado para a locomoção central (Ramos *et al.*, 1999), todos os outros são inéditos na literatura.

O resultado, a princípio surpreendente, de *Ofil1* ter efeito em machos neste estudo, pode ser parcialmente explicado através de alguns estudos já publicados na literatura. Por exemplo, Mormède *et al.* (2002), através de uma estratégia baseada em seleção por marcadores moleculares, já tinham previamente sugerido que o efeito do QTL *Ofil1* poderia ser encontrado nos animais de ambos os sexos. Por outro lado, cabe ressaltar que Vendruscolo *et al.* (2006a), com uma técnica parecida, sugeriram que este efeito seria mesmo somente observado em fêmeas. Deste modo, podemos observar que a região genômica em questão é realmente importante para os comportamentos relacionados à emocionalidade e que, apesar da inconsistência em alguns trabalhos, ela pode estar afetando os dois sexos. Entretanto, nenhum destes

dois trabalhos citados anteriormente utilizou uma técnica de mapeamento genômico, como a que foi realizada no presente estudo.

A técnica de QTL nos dá a vantagem de repetir com mais fidelidade o estudo original de Ramos *et al.* (1999). Além disso, nós utilizamos aqui o dobro de animais do que este último, o que deve ter aumentado o poder de detecção estatística de um QTL (Flint *et al.*, 2005). Assim, nós não podemos descartar que no estudo prévio de Ramos *et al.* (1999), a ausência do efeito do QTL em machos possa se tratar de um resultado falso negativo e que, mesmo naquele estudo, com um maior número de animais, os efeitos de *Ofil1* seriam também observados em machos. De fato, Crusio (2004) sugeriu que um baixo número de animais utilizados em uma análise de QTL pode dificultar o aparecimento de regiões associadas ao fenótipo, sendo que este problema torna-se ainda maior para fenótipos com herdabilidade em torno de 10-25%, que é o valor normalmente encontrado em estudos de características comportamentais.

Como visto na Tabela 8, o sentido do efeito dos alelos no QTL *Ofil1* é invertido, ou seja, os animais F2 que apresentam maior locomoção central são os que têm alelos LEW nesta região genômica. O contrário é verificado com os animais das linhagens puras, pois animais LEW são os que apresentam menores índices de locomoção central (Ramos *et al.*, 1997; Izídio *et al.*, 2005b). Este resultado, aparentemente contraditório, já era esperado, pois o estudo prévio que identificou *Ofil1* nestas linhagens já tinha relatado este efeito (Ramos *et al.*, 1999). Vários QTL de efeito contrário ao esperado têm sido relatados na literatura (Caldarone *et al.*, 1997; Wehner *et al.*, 1997; Mogil *et al.*, 1997; Kóvacs *et al.*, 1997; Moisan *et al.*, 2002; Llamas *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007), sugerindo que este fenômeno não é raro. De fato, como estas

características são quantitativas, elas dependem de muitos genes diferentes e, mesmo que uma linhagem apresente um fenótipo “alto”, ela poderá ter alguns alelos “baixos” que vão contrabalançar a característica. Isto se torna ainda mais comum quando o estudo é realizado com duas linhagens que não foram previamente selecionadas para a característica em estudo, como é o presente caso. Como neste estudo nós focamos no cromossomo 4 apenas, outros QTL poderiam estar presentes ao longo do genoma onde alelos do tipo LEW diminuiriam a locomoção central. Aliás, Ramos *et al.* (1999) já sugeriram que no cromossomo 7 do rato existe um QTL que influencia comportamentos relacionados à ansiedade e tem os alelos na população F2 indo no mesmo sentido do verificado nas linhagens parentais. Estudos futuros, utilizando o mesmo DNA já usado no presente estudo, poderão também verificar a presença deste ou de outros QTL contribuindo para a locomoção central nas populações LEW e SHR brasileiras ao longo de outros cromossomos.

O QTL *Ofil1* pode também ser dependente de interações epistáticas com outros *loci*. Como no nosso estudo o QTL foi detectado a partir do estudo de uma população F2, nós não podemos descartar que esta região genômica esteja mascarada por outros *loci* nas linhagens parentais. Além do mais, esta hipótese é bastante provável, dada a influência excepcionalmente forte deste QTL. A porcentagem de variância explicada por *Ofil1* no estudo prévio de Ramos *et al.* (1999) foi estimada em 50,4% da variabilidade total (com um lod score de 7,22), o que o colocaria como um dos QTL mais fortes já encontrado em ratos. Como pode ser observado na Figura 11, parecem existir dois picos distintos para a locomoção central no CA. Entretanto, o intervalo de confiança através do método de *drop-off* e o método de *bootstrap* não nos permitem, com

o número atual de animais, confirmar a existência de outro QTL significativo, além de *Ofil1*, para a locomoção central no CA.

Se, por um lado, o efeito de *Ofil1* em machos confirma e amplia os dados a respeito desta importante região genômica na regulação de comportamentos relacionados à emocionalidade, por outro, a falta de efeito de *Ofil1* em fêmeas levanta alguns questionamentos. Ramos *et al.* (1999) mostraram em seu estudo prévio que o efeito de *Ofil1* na locomoção central do CA estaria presente somente em fêmeas netas de avós LEW, mas não nas netas de avós SHR. Baseado nesta informação, no presente estudo, nós utilizamos somente fêmeas LEW (que foram cruzadas com machos SHR) no intercruzamento original que deu origem aos animais F1 e posteriormente aos F2. Conseqüentemente, nós esperávamos que o QTL para a medida locomoção central no CA fosse também, e principalmente, ser encontrado nas fêmeas. Como já comentado, esta hipótese não se confirmou e alguns pontos podem ser levantados para explicar a ausência deste QTL em fêmeas neste estudo.

O primeiro deles, sugere que fatores ambientais idiossincráticos a cada um dos estudos podem ter contribuído nas diferenças de expressão do QTL (Chesler *et al.*, 2002; van der Staay e Steckler, 2002; Würbel, 2002; Wahlsten *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2006a; b). Por exemplo, em um importante trabalho, Crabbe *et al.* (1999) mostraram que mesmo com grandes esforços para padronizar o ambiente de laboratório ou a situação de teste, os resultados de testes comportamentais entre diferentes laboratórios podem não ser consistentes. Naquele estudo, as linhagens de camundongos A/J e 129/SvEvTac, quando comparadas uma com a outra, demonstraram maior ou

menor resposta locomotora para a cocaína, dependendo do laboratório onde foram testadas, apesar dos fatores ambientais terem sido rigorosamente controlados. Mesmo em humanos, mostrou-se que alguns genes podem aumentar a prevalência de transtornos afetivos somente quando combinados com contextos ambientais específicos (Caspi *et al.*, 2003; Gordon e Hen, 2004). Assim, estes dados revelam que sutis variações ambientais não controladas entre e dentro de laboratórios, podem influenciar estudos comportamentais, farmacológicos e genéticos.

O segundo ponto é que podem existir divergências genéticas entre as sub-linhagens LEW e SHR brasileiras e francesas. Estudos filogenéticos recentes indicam que os animais LEW e SHR estão entre as linhagens com maior diversidade genética entre as diferentes populações espalhadas pelo mundo (The Star consortium, 2008). Ou seja, existem hoje mais de 15 sub-linhagens de animais LEW e mais de 25 de SHR (Rat genome database, 2008). Acredita-se que a causa desta grande divergência genética pode ter origem na distribuição dos animais para diferentes laboratórios antes deles estarem completamente isogênicos. Além disso, ao longo das gerações, os animais podem acumular mutações que os tornam diferentes das suas populações originais de onde foram derivados. Por exemplo, alguns estudos demonstram diferenças comportamentais entre sub-linhagens de ratos provenientes de diferentes lugares (Glowa *et al.*, 1994; Rex *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 2002). Mesmo em sub-linhagens LEW e SHR, algumas diferenças no campo de pesquisa do estresse já foram relatadas (Glowa *et al.*, 1994; Stöhr *et al.*, 1999), alertando-nos para a importância deste fator. Ou seja, estas observações indicam que, ao menos para algumas linhagens isogênicas, o uso

de diferentes sub-linhagens pode ter um efeito significativo no resultado e na reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, dados recentes de nosso laboratório ainda não publicados, com linhagens semi-congênicas derivadas de LEW e SHR, sugerem que a região de *Ofil1* pode ser efetiva apenas em machos.

Por fim, outro ponto que poderia ter causado a falta de efeito do QTL *Ofil1* nas fêmeas do presente estudo, são as influências de fatores hormonais. Sabe-se que o ciclo estral das fêmeas tem influência nos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE (Mora *et al.*, 1996), fazendo até mesmo com que tratamentos farmacológicos tenham resultados ansiolíticos ou ansiogênicos dependendo da fase em que as fêmeas são testadas (Díaz-Véliz *et al.*, 1997). Maguire *et al.* (2005) mostraram que as camundongas testadas no LCE durante o diestro foram menos ansiosas do que aquelas testadas no estro, sendo que este resultado poderia estar relacionado à super-expressão da subunidade  $\delta$  dos receptores GABA<sub>A</sub> no diestro destas fêmeas. Alguns pesquisadores também sugerem que o ciclo estral das fêmeas pode influenciar comparações comportamentais no teste do CA, e que estas influências parecem ser genótipo-específicas (Meziane *et al.*, 2007). Assim, a possível influência dos fatores hormonais na expressão de *Ofil1* também foi investigada neste trabalho e será posteriormente discutida nesta seção.

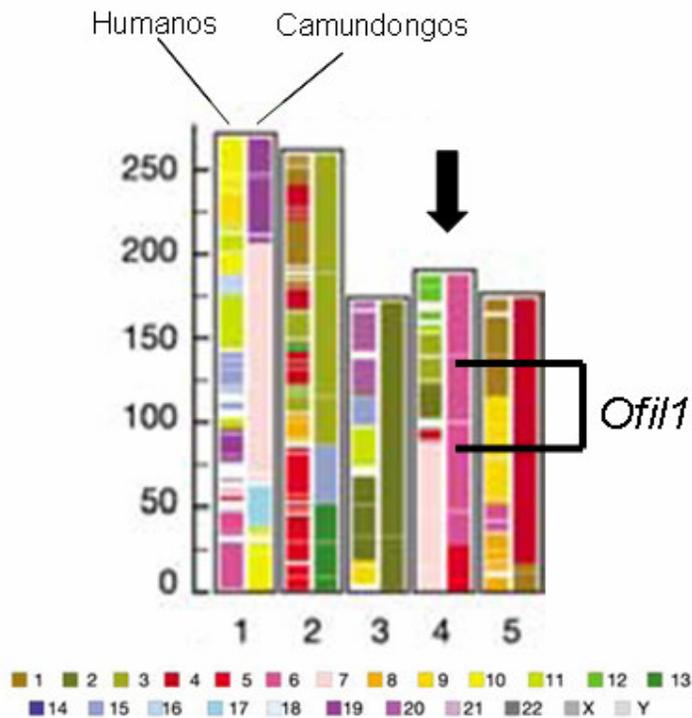
Como pode ser observado no estudo de Ramos *et al.* (1999), a parte da curva significativa de *Ofil1* compreendia uma grande região genômica localizada entre os marcadores D4RAT37 e D4MGH11 (um intervalo de aproximadamente 78Mb). No presente estudo, provavelmente, devido ao maior número de animais F2 utilizados, a parte da curva que excedeu o limite de

significância foi reduzida para cerca de 38Mb (Figura 14). Entretanto, a porcentagem da variância total explicada pelo QTL que era de 50,4% Ramos *et al.* (1999) caiu para 14% no presente estudo. Apesar desta redução parecer, a princípio, diminuir a importância de *Ofil1*, o valor de 14% ainda é considerado alto. Por exemplo, Flint *et al.* (2005) revisaram diversos estudos de QTL para fenótipos comportamentais e fisiológicos e demonstraram que a maioria deles tem um pequeno efeito, contribuindo com aproximadamente 6% da variância fenotípica total. De igual maneira, utilizando camundongos heterogêneos, Valdar *et al.* (2006) identificaram 843 QTL para uma grande variedade de fenótipos. Destes, apenas 10 tinham efeitos maiores do que 5%, enquanto que 109 apresentavam efeitos menores do que 2%.

A redução do tamanho da região genômica de *Ofil1* nos proporcionou, com a ajuda de algumas páginas disponíveis na internet, realizar a construção de um mapa de homologia genética entre ratos, camundongos e humanos. Estas comparações são importantes, pois o estudo de regiões ortólogas em diferentes espécies poderá revelar genes com uma grande relevância na etiologia dos transtornos humanos. (<http://www.rgd.mcgw.edu/VCMAP/mapview.shtml>, <http://www.informatics.jax.org/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ensembl.org>; [http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/comparative\\_home.pl](http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/comparative_home.pl)).

Desta maneira, podemos observar que a região genômica que contém o intervalo de confiança de 96,8% do QTL *Ofil1* do presente estudo (de 85Mb até 130Mb), está contida inteiramente no cromossomo 6 dos camundongos (55Mb até 92Mb) e nos cromossomos 2, 3, 4 e 7 dos humanos. Estes dados são

condizentes com o que está publicado na literatura (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004; Figura 27).



**Figura 27** - Os cinco primeiros cromossomos do rato (eixo x) e sua homologia com os cromossomos humanos (coluna esquerda) e com os cromossomos do camundongo (coluna da direita). O tamanho dos cromossomos está representado em megabases (eixo y). A região de *Ofil1* no cromossomo 4 está marcada pelos traços pretos. A seta aponta o cromossomo 4 do rato. Figura adaptada de Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004).

Segundo o RGD (<http://rgd.mcw.edu/>), existem um total de 18 QTL mapeados no genoma do rato e 20 no genoma do camundongo para

comportamentos relacionados à ansiedade. Destes todos, *Ofil1* é o QTL com o maior *lod score* (7,22) e o único que está mapeado no cromossomo 4 do rato. Ainda segundo o RGD, três QTL para comportamentos relacionados à ansiedade estão mapeados no cromossomo 6 do camundongo (o cromossomo que corresponde a grande parte do cromossomo 4 do rato). Eles são denominados Aaj2\_m (Chr06: 7Mb; 4.9 cM); Aaj3\_m (Chr06: 116Mb; 52.5 cM;) e Axtq2\_m (Chr06: 7Mb; 4.9 cM). Todos estes QTL foram mapeados para comportamentos exibidos no CA ou na CBP (Singer *et al.*, 2004; 2005). Porém, estes QTL estão localizados na parte proximal do cromossomo 6 do camundongo e fora do trecho correspondente ao intervalo de confiança de *Ofil1* encontrado no presente estudo em ratos. Ou seja, aparentemente, os genes responsáveis pelos QTL encontrados no cromossomo 6 de camundongos não são os mesmos responsáveis pelos efeitos de *Ofil1* em ratos. Na verdade, a partir de alguns estudos publicados na literatura, podemos perceber que, em camundongos, o cromossomo 1 é um forte candidato a conter genes que afetem comportamentos relacionados à esquiva/aproximação do centro do CA (Henderson *et al.*, 2004; Yalcin *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2005; Willis-Owen e Flint, 2006). Entretanto, esta região do genoma de camundongos não está contida no cromossomo 4 em ratos (Figura 27).

Em humanos, diversos trabalhos já publicados encontraram regiões genômicas que podem conter genes importantes para as psicopatologias abordadas no presente estudo. Alguns destes localizam-se em regiões homólogas ao cromossomo 4 dos ratos. Por exemplo, existe no cromossomo 2 de humanos um locus de predisponibilidade para o desenvolvimento de depressão em mulheres (Zubenko *et al.*, 2002). Ainda neste mesmo

cromossomo, outro locus de predisponibilidade para a comorbidade entre depressão e alcoolismo já foi encontrado (Nurnberger *et al.*, 2001). Do mesmo modo, no cromossomo 4, um locus que influencia a tentativa de suicídio em pacientes com depressão maior (Zubenko *et al.*, 2004) e um outro relacionado à ansiedade, também já foram mapeados (Middeldorp *et al.*, 2008). No cromossomo 7, existe um QTL, exclusivo de mulheres, para medidas de depressão e ansiedade (Nash *et al.*, 2004), confirmando a importância de fatores ligados ao sexo na etiologia da ansiedade e da depressão. Além deste, outros estudos já revelaram loci para a depressão (Nurnberger *et al.*, 2001) e transtorno de pânico (Middeldorp *et al.*, 2008) no cromossomo 7. Por fim, no cromossomo 3 um locus de susceptibilidade para transtornos bipolares (Badenhop *et al.*, 2002) e outro para o risco de agorafobia (Gelernter *et al.*, 2001) já foram descritos.

Nossa terceira hipótese era que a região genômica de *Ofil1* influenciaria comportamentos ligados à emocionalidade e ao consumo de etanol, apresentando, assim, um efeito pleiotrópico. Esta hipótese se baseava no fato de que Vendruscolo *et al.* (2006) já haviam sugerido uma possível participação de *Ofil1* nos comportamentos relacionados ao consumo de etanol. Além disso, no cromossomo 4, próximo à região onde *Ofil1* localiza-se, outros três QTL's para características relacionadas à emocionalidade e ao consumo de etanol foram mapeados (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003a; Potenza *et al.*, 2004). Contudo, como foi discutido anteriormente, os comportamentos relacionados à ansiedade e ao consumo de etanol parecem ser independentes nestes animais F2, não dando suporte a esta hipótese. Os resultados da matriz de correlação demonstraram, apenas em machos,

algumas poucas correlações significativas entre os testes do CA-CBP e o consumo de etanol. Na maioria dos casos, os animais menos ansiosos foram os que beberam maiores quantidades de etanol, ou seja, uma correlação negativa entre estes comportamentos. Além disto, na ACP, nenhuma medida dos testes de “ansiedade” ficou no mesmo fator daquelas relacionadas ao consumo de etanol.

Em relação a análise de QTL, na região genômica de *Ofil1* não foram encontrados QTL's significativos para o consumo de etanol, apesar de que alguns QTL sugestivos estão ali presentes. A Tabela 8 demonstra que o QTL pleiotrópico significativo encontrado na CBP localiza-se perto do marcador D4MGH11 e, perto dele, há um QTL para consumo de etanol forçado. Porém, os outros QTL significativos não são pleiotrópicos, ou seja, não apresentam efeitos simultâneos sobre diferentes medidas comportamentais. Desta maneira, o conjunto de resultados indica que os genes que influenciam os comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol não devem ser os mesmos. Ou ainda, em uma explicação alternativa, que o efeito deles seja mais fraco sobre as medidas de consumo de etanol do que sobre as medidas de ansiedade/emocionalidade.

A quinta hipótese desta primeira estratégia experimental, era que existiriam QTL no cromossomo 4 do rato influenciando outras medidas comportamentais de emocionalidade além da locomoção central no CA. Como vemos nos resultados, outros quatro QTL significativos (além do *Ofil1* para locomoção central) foram encontrados em machos, sendo que todos eles são inéditos em estudos com as linhagens LEW e SHR (Figura 11-12 e Tabela 8). O primeiro deles influencia a defecação no CA. Sabe-se que o teste do CA foi

proposto originalmente por Calvin Hall (1934) proporcionando duas medidas de emocionalidade, negativamente relacionadas, a locomoção e a defecação. Ou seja, um animal mais “ansioso” no CA defecaria mais e se locomoveria menos (Ramos e Mormède, 1998; Henderson *et al.*, 2004; Hinojosa *et al.*, 2006). Os trabalhos publicados na literatura nem sempre corroboram esta visão (Archer, 1973), mas na atualidade, diversas outras medidas comportamentais são obtidas em um teste do CA (Archer, 1973; Walsh e Cummins, 1976; Prut e Belzung, 2003; Ramos e Mormède, 2006). Este QTL se localiza cerca de 20 cM distante de *Ofil1*, mas está numa posição genômica muito próxima onde a  $\alpha$ -sinucleína está mapeada. Como vemos na Tabela 9, neste QTL os alelos dos animais “ansiosos” LEW estão aumentando a defecação.

Alguns QTL já foram descritos para esta medida comportamental. Por exemplo, Flint *et al.* (1995), utilizando as linhagens de camundongos DeFries H e L, sugeriram que os cromossomos 1 e 12 de camundongos conteriam regiões genômicas importantes para a defecação no CA. Além deste, outros estudos com estes mesmos camundongos sugeriram QTL nos cromossomos 1, 7, 14 e X para esta medida comportamental (Turri *et al.* 2001a; b; Henderson *et al.*, 2004). Singer *et al.* (2005), utilizando um painel de linhagens com substituições cromossômicas (derivadas das linhagens de camundongos A/J e C57BL/6J), sugeriram que os cromossomos 6 e 17 também influenciariam a defecação no CA. De maneira interessante, parte do cromossomo 4 em ratos corresponde ao cromossomo 6 dos camundongos, sugerindo que alguns genes reguladores desta característica podem estar presentes nas duas espécies. Entretanto, poucos estudos relataram em ratos algum QTL para a defecação no CA. Por exemplo, Fernández Teruel *et al.* (2002), utilizando as linhagens de ratos

Romanos *High* e *Low Avoidance*, identificaram QTL para defecação nos cromossomos 3, 6, 19 e X.

O segundo QTL inédito encontrado no presente estudo influencia a locomoção periférica no CA. Este QTL foi encontrado utilizando-se o modelo aditivo e foi o QTL significativo com o menor LRS em machos. Nele, os alelos dos animais LEW aumentam a locomoção dos animais F2 na área periférica do aparato (Tabela 8). Tradicionalmente, esta medida comportamental é vista como um índice de locomoção, mas como já discutido anteriormente, ela pode ser mais complexa do que aparenta (Paulus e Geyer, 1993; Ramos *et al.*, 2003). No presente estudo, por exemplo, a locomoção periférica correlacionou-se positivamente com a locomoção central, em ambos os sexos (Tabelas 4-5). Alguns QTL já foram descritos para a atividade locomotora no CA em camundongos. Por exemplo, Takahashi *et al.* (2008), utilizando linhagens consômicas, mapearam um locus para atividade locomotora no CA no cromossomo 6 de camundongos. Além deste, Turri *et al.* (2001a), utilizando os camundongos DeFries H e L, também demonstraram QTL envolvidos com a atividade locomotora no CA nos cromossomos 1, 4, 7, 12 e 15.

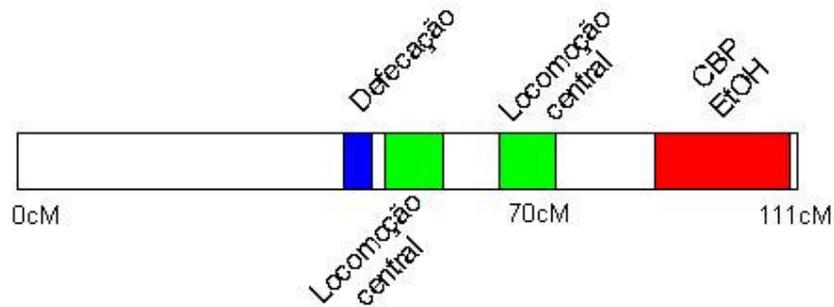
O terceiro QTL apresentou um efeito pleiotrópico sobre três medidas comportamentais diferentes do teste da CBP. Neste QTL os alelos dos animais LEW, contrariamente ao esperado, aumentam o tempo e a locomoção na área branca e aversiva e diminuem o tempo gasto no compartimento preto (efeito transgressivo) (Tabela 8). Estas medidas comportamentais são vistas como índices de emocionalidade neste aparato. Assim, tradicionalmente, ratos ou camundongos que estão menos “ansiosos” permanecem mais tempo no compartimento branco e luminoso (Crawley, 1981; Costall *et al.*, 1989; Izídio *et*

*al.*, 2005b). Turri *et al.* (2001a), utilizando os camundongos DeFries, identificaram quatro QTL para a atividade no lado escuro da CBP nos cromossomos 1, 4, 12 e X. Neste mesmo estudo, os autores também mapearam QTL nos cromossomos 1, 11, 14, 15 e 18 para o tempo e atividade no compartimento luminoso (Turri *et al.*, 2001a). Ainda com estas linhagens de camundongos, já foram identificados QTL para a atividade e tempo gasto no compartimento escuro nos cromossomos 1, 4, 14, 15, 18 e X (Henderson *et al.*, 2004), assim como, para o tempo gasto no compartimento branco nos cromossomos 1, 4, 14, 15, 16 e 18 (Flint *et al.*, 1995; Turri *et al.*, 2001b). Estes estudos citados anteriormente, também sugerem que o cromossomo 1 de camundongos tem uma grande relevância para comportamentos relacionados à ansiedade na CBP, assim como no CA (Henderson *et al.*, 2004; Yalcin *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2005; Willis-Owen e Flint, 2006).

Por fim, o quarto QTL inédito foi encontrado para o consumo de etanol forçado (10%). Neste, os alelos LEW aumentaram o consumo de etanol nos animais F2 (Tabela 8). Alguns QTL, ao longo do cromossomo 6 do camundongo (correspondente ao cromossomo 4 em ratos), estão relatados na literatura como afetando o consumo e a preferência por esta droga (Vadasz *et al.*, 2007; Hitzemann *et al.*, 2008; Tabakoff *et al.*, 2008). Entretanto, em ratos, está descrito o QTL que talvez tenha a maior importância para o presente estudo (Terenina-Rigaldie *et al.* 2003b). Naquele trabalho, os autores encontraram um QTL significativo no cromossomo 4, próximo ao *Ofil1*, que afetava a livre-escolha entre água e etanol (5%) em ambos os sexos. Ainda no mesmo trabalho de Terenina-Rigaldie *et al.* (2003b), outro QTL afetando a livre-escolha entre etanol 10% e água com efeito sugestivo foi encontrado no

cromossomo 4. O efeito deste QTL era invertido quando comparado com as linhagens parentais. De maneira interessante, o QTL significativo e o sugestivo estavam localizados aproximadamente na mesma região onde foi encontrado *Ofil1*. Torna-se, então, importante lembrar que Terenina-Rigaldie *et al.* (2003b) utilizaram as linhagens de ratos HEP e WKY. Sabe-se que os ratos SHR derivam da mesma população de onde os ratos WKY surgiram e, portanto, estas duas linhagens podem apresentar uma grande similaridade genética. Além disso, outro trabalho do mesmo grupo mostrou diferenças relacionadas à emocionalidade entre as linhagens HEP e WKY (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003a), sugerindo um pleiotropismo do QTL em medidas de emocionalidade e consumo de etanol. Como visto e discutido no presente estudo, a hipótese de uma ligação genética entre “ansiedade” e “alcoolismo” não pode ser completamente corroborada.

Então, devido ao conjunto de dados expostos nos parágrafos anteriores, podemos concluir que a quinta hipótese deste estudo foi confirmada, pois realmente existem no cromossomo 4 dos ratos F2 derivados de LEW e SHR alguns QTL para outras medidas comportamentais de emocionalidade, além da locomoção central. Os diferentes QTL, encontrados na primeira parte do presente estudo, podem ser, de forma resumida, representados na Figura 28.



**Figura 28** – Regiões genômicas associadas com o fenótipo, na primeira análise de QTL. A barra horizontal representa os 111cM do cromossomo 4 (0cM na esquerda e 111cM na direita). As regiões coloridas representam uma estimativa da área que está acima do limite de significância para cada QTL (modelo livre). Em azul, a defecação no CA; em verde, os dois picos para a locomoção central; e em vermelho, uma grande região que contém os QTL para tempo no compartimento preto e locomoção no compartimento branco da CBP e consumo de etanol forçado.

Além dos QTL significativos, alguns outros com LRS (likelihood ratio statistic) sugestivos também foram encontrados (Tabela 9). Segundo Flint *et al.* (2005), são necessários centenas de animais F2 para se encontrar QTL de efeito fraco (que contribuam com 5% do efeito genético). Neste estudo, foram utilizados um total 193 animais F2 e, portanto, regiões genômicas contendo genes de menor efeito podem não atingir níveis de significância. Contudo, estas regiões são igualmente importantes, já que a natureza dos comportamentos complexos é quantitativa e dependente de vários genes (Complex Trait Consortium, 2003). De maneira interessante, quatro QTL nos machos apresentaram o nível sugestivo para o consumo de etanol (2,5%) próximo ao marcador D4RAT164; (5 e 10%) próximo a D4RAT151; (10%)

próximo a D4MIT16 e (20%) D4RAT206 (Tabela 9). De maneira interessante, a região genômica onde está localizada o marcador D4RAT164 fica próxima ao QTL encontrado no estudo de alcoolismo com os ratos P e NP (Carr *et al.*, 1998; Bice *et al.*, 1998), sugerindo que o modelo LEW/SHR também pode apresentar os mesmos genes que influenciam o consumo de etanol, apesar de aparentemente eles não participarem da regulação de comportamentos emocionais.

Como comentado brevemente acima, fatores hormonais poderiam ter causado a ausência do efeito de *Ofil1* em fêmeas (sexta hipótese). Deste modo, nós produzimos e testamos mais 96 fêmeas F2 LEW/SHR para a realização de uma nova análise de QTL, levando em conta a fase do ciclo estral em que estas fêmeas estavam no momento do teste. Elas foram testadas no CA e CBP, os dois testes comportamentais que apresentaram os QTL mais significativos em machos, na primeira análise de QTL. Os resultados dos testes comportamentais do CA e CBP sugerem que existem importantes diferenças comportamentais nestes aparatos entre as fêmeas F2 que estavam em diestro-proestro ou estro-metaestro. Podemos observar que as fêmeas no diestro-proestro são as que exibem menores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade no teste do CA (Figura 15). Estes dados estão de acordo com os comportamentos observados em alguns estudos e o sugerido papel da progesterona nas ratas. Por exemplo, sabe-se que no proestro os níveis de progesterona estão elevados (Zuluaga *et al.*, 2005) e sugere-se que ela apresente uma diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade nas fêmeas (Díaz-Véliz *et al.*, 1997; Frye e Wolf, 2002; Gómez *et al.*, 2002). Além disso, vemos a partir de dados publicados, que as fêmeas no proestro

demonstram uma redução nos comportamentos relacionados à ansiedade (evidenciado pelo aumento de tempo gasto nos braços abertos do LCE) e à depressão, devido a baixa imobilidade no TNF (Contreras *et al.*, 1998; Frye *et al.*, 2000). Alguns estudos também sugerem que possa existir um baixo nível de “ansiedade” no diestro, sendo que o resultado poderia estar relacionado à super-expressão da subunidade  $\delta$  dos receptores GABA<sub>A</sub> nesta fase (Maguire *et al.*, 2005).

Nós podemos observar, a partir da Tabela 10 e da Figura 16, que as fêmeas nas fases diestro-proestro apresentam um QTL para a locomoção central no CA na mesma região de *Ofil1*. Este QTL, apesar de ser apenas sugestivo, também é transgressivo (alelos LEW aumentam a locomoção central ao invés de diminuir) como *Ofil1*, o que reforça as chances de que se trate do mesmo QTL dos machos e do mapeado por Ramos *et al.* (1999). De maneira interessante, as fêmeas no estro-metaestro não apresentam este QTL para a locomoção central na mesma região genômica. Sabe-se que o ciclo estral das fêmeas tem duração de 4 a 5 dias e que a fase de maior duração temporal é o diestro, que dura aproximadamente 57h (Hebel e Stromberg, 1986). Portanto, em um estudo aleatório, onde nenhum controle do ciclo estral seja realizado, existe uma maior probabilidade de que as fêmeas encontrem-se em diestro-proestro (~69h de duração) do que em estro-metaestro (~33h de duração). A ausência deste QTL em fêmeas na primeira análise de QTL deste estudo, talvez possa ser explicada pela presença de diferentes fases do ciclo estral naquela população ou da sincronia da maioria das fêmeas no estro-metaestro. Como visto na figura 17, quando levamos em conta todas as fêmeas (primeira e segunda análises de QTL juntas), sem considerar o ciclo estral, o QTL não

atinge nem ao menos o limiar sugestivo. Por outro lado, o aparecimento do QTL para a locomoção central em fêmeas no estudo de Ramos *et al.* (1999), poderia ser explicado pela provável presença de uma maioria de fêmeas em diestro ou proestro o que pode, casualmente, não ter ocorrido aqui. Assim, devido aos dados obtidos nesta segunda análise de QTL, a hipótese de que a fase do ciclo estral poderia afetar a expressão de *Ofil1* é, ao menos em parte, corroborada. Entretanto, apesar das diferenças comportamentais e de expressão de *Ofil1* entre os grupos utilizados, podemos observar a partir das tabelas 10 e 11, que em ambas as fases, na segunda análise de QTL, o efeito de *Ofil1* foi transgressivo, o que não ocorreu na primeira análise. Outros estudos serão necessários para confirmar definitivamente a influência da fase do ciclo sobre *Ofil1* e até mesmo verificar se existe uma fase específica onde os alelos provenientes dos animais LEW não aumentem a locomoção central. É interessante observar que, dos três QTL significativos encontrados nas fêmeas agrupadas por fase do ciclo estral, ao menos dois deles corroboram totalmente resultados obtidos com os ratos machos e apontam a extremidade do cromossomo 4, próximo a D4RAT206, como um importante e novo QTL para emocionalidade medida na CBP em ratos, onde alelos LEW aumentam os níveis de exploração do ambiente branco e aversivo.

Com o passar do tempo e com os avanços das técnicas e procedimentos, o genoma está se tornando cada vez melhor caracterizado possibilitando a identificação de QTL com menores efeitos. Por isso, o maior desafio da genética moderna é agora passar da identificação de QTL, que são regiões normalmente grandes, ao (s) seu (s) gene (s) ou até mesmo aos nucleotídeos (QTN) responsáveis pelo QTL. Dos cerca de 2000 QTL

identificados até o momento em roedores, estima-se que somente 1% dos genes tenham sido clonados (Willis-Owen e Flint, 2006), um número que demonstra que ainda existe uma grande lacuna no caminho QTL-gene. Entretanto, o emprego de diferentes estratégias complementares de pesquisa com o intuito de estreitar a região do QTL de interesse é, na atualidade, muito promissor. Por exemplo, pode-se utilizar a combinação de diferentes mapas genéticos (Belknap e Atkins, 2001), a identificação de regiões sintênicas entre roedores e humanos (Watanabe *et al.*, 1999), a análise de haplótipos (DiPetrillo *et al.*, 2005), assim como a análise de *micro-arrays* que pode identificar diferenças na expressão gênica em tecidos específicos (Chesler *et al.*, 2005; Letwin *et al.*, 2006; Le Niculescu *et al.*, 2007).

Assim, no presente momento, parecemos estar vivendo uma nova era dentro da genética onde os conhecimentos gerados a partir de estudos de QTL em roedores vêm sendo aplicados em humanos com o intuito de se aprofundar o conhecimento de algumas patologias. Por exemplo, Yalcin *et al.* (2004) identificaram um gene chamado *Rgs2*, um regulador da proteína G, que era o responsável por um QTL localizado no cromossomo 1 do camundongo e que afetava comportamentos relacionados à ansiedade. Posteriormente, Smoller *et al.* (2008) demonstraram que este mesmo gene também está associado à ansiedade humana. Outras tentativas vêm sendo realizadas a partir da identificação de novos QTG (o gene responsável pelo efeito de um QTL) em roedores. Contudo, a especificidade de cada um dos organismos envolvidos (ratos, camundongos, humanos) e a divergência filogenética, ao menos naqueles separados por um grande tempo evolutivo, torna estes estudos ainda bastante desafiadores (Fullerton *et al.*, 2008).

## 5.2 Segunda estratégia experimental

Como comentado brevemente no começo desta discussão, paralelamente ao andamento da primeira estratégia experimental, foi realizada uma outra abordagem com o intuito de se avaliar alguns genes que poderiam explicar o efeito de *Ofil1*. Sabe-se que muitos genes contribuem para os comportamentos relacionados à ansiedade, à depressão e ao alcoolismo. Enquanto que a estratégia de análise de QTL define regiões genômicas importantes, mas que podem conter diversos genes diferentes influenciando a característica, outras abordagens têm ganhado força no sentido de se descobrir quais são estes genes. Em uma destas abordagens, pode-se tentar avaliar genes candidatos que estejam já mapeados naquela região cromossômica e que estejam descritos na literatura como potencialmente relacionados à característica fenotípica em estudo. Estes genes podem ser analisados comparativamente entre as linhagens parentais (as que deram origem ao QTL) através: da análise de DNA (*Southern Blot*, análise de SNP, seqüenciamento gênico), da expressão de RNA mensageiro (RNAm) (*Microarrays*, *Real-Time RT-PCR*, *Northern Blot*, *Total gene expression analysis* (TOGA)) ou da quantificação da forma final da proteína (*Western Blot*, imunohistoquímica).

No presente estudo, as linhagens LEW e SHR apresentaram diferenças comportamentais nos testes do LCE e CBP, com a linhagem LEW sendo a considerada mais “ansiosa” (Figura 18 e 20). Apesar da aparente solidez deste modelo genético animal, alguma variabilidade entre diferentes estudos têm sido observada. Por exemplo, diferenças entre as linhagens na % de entradas nos

braços abertos, um dos principais índices de ansiedade do LCE, foram algumas vezes, mas não sempre, significativas em machos ou fêmeas, dependendo do estudo (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002; Vendruscolo *et al.*, 2003). Nos testes de consumo de etanol, os resultados obtidos (Figura 21) foram ao encontro da hipótese de uma comorbidade ou correlação positiva entre “ansiedade” e “alcoolismo” (Stewart *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1995; Möller *et al.*, 1997). Entretanto, este ponto é bastante controverso, pois diversos estudos têm mostrado a falta desta correlação em humanos e roedores (Tuominen *et al.*, 1990; Viglinskaya *et al.*, 1995; Overstreet *et al.*, 1997; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004; 2005). Dentre estes Da Silva *et al.* (2004) e (2005) utilizaram as linhagens LEW/SHR em testes de consumo de etanol, as mesmas que foram estudadas aqui, e não encontraram a suposta correlação positiva sugerida no presente estudo. Porém, existem diferenças significativas entre os protocolos utilizados nestes diferentes estudos como: a duração do experimento, as concentrações de etanol utilizadas, a presença de um período de etanol forçado, a utilização de substâncias controles de sabor e o tipo de gaiola utilizada para avaliação do consumo. Da mesma maneira, Suzuki *et al.* (1988) mostraram um maior consumo de etanol em ratos LEW do que em ratos F344, um resultado que foi o contrário do relatado por Taylor *et al.* (2006). Estudos futuros deverão avaliar o papel dos fatores ambientais na regulação do comportamento de ingestão de etanol nestas linhagens.

Diversos genes estão mapeados na região genômica de *Ofil1* no cromossomo 4 do rato e, destes todos, dois genes aparecem como potenciais candidatos a explicar este QTL, o gene *Snca* e o *Tac1r*. O primeiro deles

(*Snca*) está localizado no braço longo do cromossomo 4 do rato, mais precisamente na posição 90Mb, codificando para a proteína  $\alpha$ -sinucleína. Esta proteína é expressa ao longo de todo o sistema nervoso central (SNC) e está em particular abundância nos terminais pré-sinápticos (Mori *et al.*, 2002), inibindo a tirosina hidroxilase e levando assim a uma redução na síntese de catecolaminas, dentre elas a dopamina (Perez *et al.*, 2002). Além disso, sugere-se que a  $\alpha$ -sinucleína diminui a atividade do transportador de dopamina (Wersinger *et al.*, 2003; Wersinger e Sidhu, 2005), levando a uma diminuição de recaptação. Sabe-se que animais nocaute para a  $\alpha$ -sinucleína exibem menores respostas locomotoras à anfetamina (Abeliovich *et al.*, 2000), enquanto que animais transgênicos, que super-expressam a  $\alpha$ -sinucleína, apresentam sinais de prejuízo motor associado com um decréscimo nos níveis de tirosina hidroxilase (Masliah *et al.*, 2000). A  $\alpha$ -sinucleína está presente em grande abundância no hipocampo (Petersen *et al.* 1999; Adamczyk *et al.*, 2005), que tem participação conhecida nos transtornos de ansiedade (Bannerman *et al.*, 2004; Kalisch *et al.*, 2006) e parece estar relacionada com a etiologia do transtorno de parkinson (McGeer e McGeer, 2008). Apesar da relação muitas vezes sugerida entre esta proteína e algumas patologias, o conjunto disponível de resultados sugere que a  $\alpha$ -sinucleína pode diminuir a neurotransmissão dopaminérgica apresentando, assim, um possível efeito comportamental de interesse clínico. Assim sendo, no presente estudo, nós avaliamos o possível envolvimento da  $\alpha$ -sinucleína, supondo que ela pode ser um dos responsáveis pelos efeitos comportamentais de *Ofil1*.

O segundo gene (*Tac1r*) está mapeado no cromossomo 4 do rato, codificando para o receptor NK1 da substância P. A substância P é o

neuropeptídeo mais abundante e melhor conhecido da classe das neurocininas no SNC dos mamíferos. Juntamente com seu receptor NK1, a substância P tem sido alvo de inúmeros estudos farmacológicos, pois existem evidências de que ela esteja envolvida em processos de dor, inflamação, asma, enxaqueca, memória e ansiedade (Teixeira *et al.*, 1996; File, 1997; Wahlestedt, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Nikolaus *et al.*, 1999; Saria, 1999). Por exemplo, um estudo, utilizando substância P injetada i.p indicou um efeito bifásico (ansiolítico ou ansiogênico) dose-dependente sobre medidas comportamentais no LCE (Hasenöhrl *et al.*, 1998). O mecanismo pelo qual este neuropeptídeo atua nas respostas comportamentais de emocionalidade ainda não é completamente entendido, mas evidências indicam o envolvimento com as monoaminas e/ou de ações diretas sobre estruturas cerebrais que controlam os mecanismos emocionais, como a amígdala e o hipotálamo (Kramer *et al.*, 1998; Stahl, 1999; Saria, 1999). Um dos principais receptores da substância P é o receptor NK1. Recentemente, alguns estudos têm sugerido que este receptor possa estar envolvido nos mecanismos neurobiológicos da ansiedade (Varty *et al.*, 2002; Vendruscolo *et al.*, 2003) e da depressão (Álvaro e Di Fabio, 2007).

Desta maneira, a sétima hipótese deste trabalho seria que os genes da  $\alpha$ -sinucleína ou do receptor NK1 da substância P poderiam estar entre os responsáveis pelos efeitos de *Ofil1*. Nós observamos, a partir dos resultados deste estudo, que os níveis de RNAm da  $\alpha$ -sinucleína foram duas vezes maior no hipocampo (Figura 19a) dos ratos LEW (“ansiosos”; Figura 18 e 20) quando comparado com os SHR. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de RNAm do receptor NK1 no hipocampo ( $p=0,13$ ) e no hipotálamo ( $p=0,05$ ) dos animais LEW e SHR (Figura 19b). Este aumento na expressão

gênica do gene *Snca* foi acompanhado por um aumento de aproximadamente 50% na expressão da proteína  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo, mas não no hipotálamo, dos ratos LEW em comparação aos ratos SHR (Chiavegatto *et al.*, 2008). O resultado negativo com o gene *Tac1r* não pode nos levar a descartar totalmente a participação dele nos efeitos comportamentais de *Ofil1*, pois uma expressão gênica similar não é, por exemplo, informativa a respeito de possíveis polimorfismos na seqüência de aminoácidos entre as linhagens. Além disso, os resultados sugestivos com este gene no hipotálamo podem indicar uma relevância do mesmo nos comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol. No entanto, nós escolhemos, em um primeiro momento, continuar com a avaliação do gene candidato *Snca* que se mostrou mais promissor nos experimentos iniciais de expressão de RNAm.

De maneira interessante, Chiavegatto *et al.* (2008) encontraram um SNP entre as linhagens LEW e SHR na região 3' não transcrita (+562) do gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína. Na atualidade, diversos SNP's vem sendo descritos em diferentes genes sendo que alguns podem alterar a expressão do gene (Liang *et al.*, 2003; Liang e Carr, 2006). Alguns experimentos *in vitro* sugerem que o polimorfismo encontrado na posição +562 do gene *Snca* pode também alterar a sua expressão. Por exemplo, Chiavegatto *et al.* (2008) testaram a substituição da base nucleotídica C ou T na posição +562 do gene *Snca* em experimentos de transfecção *in vitro*. Foram construídos plasmídeos carregando as seqüências de LEW ou SHR nesta posição gênica. Os construtos foram transfectados para células PC12 de ratos e a atividade da luciferase foi comparada entre eles. O construto com a base nucleotídica C na posição +562 do gene *Snca* (ratos LEW) apresentou atividade da luciferase 91% maior do

que o construto com a base nucleotídica T (ratos SHR), um resultado que é consistente com a maior expressão do gene *Snca* e da proteína  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo dos animais LEW. Entretanto, não existiam indícios de que este polimorfismo poderia estar influenciando o comportamento *in vivo*. Para melhor elucidar esta questão, nós testamos uma população F2 LEW/SHR segregante no CA, CBP e em um protocolo de consumo de etanol e genotipamos os animais em relação a este SNP. Os resultados mostraram que os ratos que continham 2 cópias do alelo com o nucleotídeo C (CC) apresentaram maiores níveis de locomoção central no CA do que os ratos com duas cópias do alelo T (TT) (Figura 22a). Além disso, os ratos com o genótipo CC também fizeram mais locomoção periférica do que os ratos com o genótipo TT (Figura 22b). Nenhum efeito de genótipo para as medidas da CBP ou de consumo/preferência ao etanol foi encontrado (dados não mostrados). A direção desta associação (os alelos C dos animais LEW aumentando ao invés de diminuindo a locomoção central) é consistente com os estudos prévios (Ramos *et al.*, 1999; Vendruscolo *et al.*, 2006) e com diversos outros trabalhos da literatura (Caldarone *et al.*, 1997; Wehner *et al.*, 1997; Mogil *et al.*, 1997; Kóvacs *et al.*, 1997; Moisan *et al.*, 2002; Llamas *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007) que sugerem efeitos inversos de alguns alelos. Estes resultados *in vivo* reforçam a hipótese de que o polimorfismo no gene *Snca* pode participar nas diferenças comportamentais observadas entre animais LEW e SHR no CA. Por outro lado, a falta de associação entre o SNP e o consumo de etanol sugere que este polimorfismo não deve ser um bom candidato para explicar as diferenças de consumo de etanol.

Como comentado anteriormente, a  $\alpha$ -sinucleína parece ter um papel na diminuição da atividade dopaminérgica. De acordo com isto, Chiavegatto *et al.* (2008) demonstraram que a dopamina e seus metabólitos parecem estar diminuídos no hipocampo dos ratos LEW, quando comparados com os SHR. A razão entre os metabólitos da dopamina e a dopamina (um índice de recaptção) foi ~2,3 vezes menor no hipocampo dos ratos LEW. No entanto, isso não ocorre no hipotálamo, onde os níveis de dopamina e de recaptção são iguais entre as linhagens.

Uma busca no WEB-QTL ([www.genenetwork.org](http://www.genenetwork.org)) revelou correlações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a expressão de RNAm da  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo de linhagens recombinantes BXD de camundongos e diversos fenótipos que podem estar ligados à emocionalidade. Por exemplo, a atividade no CA em resposta ao etanol ( $r = -0,45$ ); a atividade exploratória no *holeboard* em resposta a cocaína ( $r = -0,61$ ); a % de tempo gasto no compartimento claro da CBP ( $r = -0,50$ ) e a expressão do transportador de dopamina no *nucleus accumbens* ( $r = -0,55$ ). Todos estes resultados obtidos *in silico* reforçam o papel potencial da  $\alpha$ -sinucleína nos comportamentos relacionados à emocionalidade através de mecanismos dopaminérgicos.

Assim, a totalidade destes resultados pode sugerir um modelo explicativo para a participação, ao menos parcial, da  $\alpha$ -sinucleína no comportamento diferencial destas linhagens no CA. Ou seja, o polimorfismo encontrado no gene da  $\alpha$ -sinucleína, pode causar uma maior expressão deste gene no hipocampo de ratos LEW, resultando em quantidades maiores da proteína  $\alpha$ -sinucleína. Esta pode estar envolvida na diminuição da recaptção e liberação de dopamina no hipocampo dos animais LEW. Este papel condiz com

a atuação da  $\alpha$ -sinucleína descrita na literatura (Perez *et al.*, 2002; Wersinger *et al.*, 2003; Wersinger e Sidhu, 2005). Cabe ressaltar, que neste trabalho apenas evidências associativas foram demonstradas e nós não apresentamos experimentos que comprovem de fato, que aumentos de expressão da  $\alpha$ -sinucleína levam à diminuição da neurotransmissão dopaminérgica.

Além disso, como já comentado anteriormente, a estratégia da análise de ligação utilizada neste estudo fornece grandes regiões genômicas envolvidas com o comportamento. Antes de chegarmos ao QTG (*quantitative trait gene*), diversos genes candidatos podem ser apontados como os responsáveis pelo QTL. Por exemplo, além da  $\alpha$ -sinucleína e do receptor NK1, na região de *Ofil1* encontram-se mapeados alguns genes interessantes: *Corticotropin realizing hormone receptor 2* (*Crhr2*) localizado na posição 84Mb; *glutamate receptor, ionotropic, delta 2* (*Grid2*) em 92Mb; *interleukin 12 receptor, beta 2* (*Il12rb2*) em 96Mb; *glutamate receptor interacting protein 2* (*Grip2*) em 126Mb; *thyrotropin releasing hormone* (*Trh*) em 126Mb. De tal modo, com os dados levantados pelo presente estudo, nós não podemos afirmar que os efeitos de *Ofil1* sejam devido ao gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína. Aliás, a localização exata do pico de *Ofil1* encontrado no presente estudo está em torno de 129Mb, o que tornaria os genes *Grip2* (proteína que interage com o receptor AMPA do glutamato) e *Trh* (hormônio de liberação da tirotrófina) melhores candidatos do que a própria  $\alpha$ -sinucleína. No entanto, é interessante observar que talvez exista outro QTL ligado a *Ofil1*, influenciando locomoção central no CA (Figura 11). Estudos futuros poderão confirmar este novo QTL, para o qual a  $\alpha$ -sinucleína seria um bom gene candidato. Assim, a ligação encontrada entre

o SNP e a locomoção central pode ser um efeito do gene que corresponderia a este segundo QTL.

Por fim, a última hipótese deste estudo era que tratamentos farmacológicos que atuam diminuindo a atividade do sistema dopaminérgico poderiam aumentar a esquiva da área central nas linhagens LEW e SHR no CA, o que viria corroborar a hipótese de envolvimento do gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína nos comportamento relacionados à ansiedade. Para avaliar esta questão, foram realizados experimentos farmacológicos com a droga dopaminérgica metilfenidato (MFD) utilizando os animais das linhagens puras LEW e SHR. O MFD é um psicoestimulante que atua bloqueando o transportador de dopamina, levando, em longo prazo e através de um mecanismo regulatório, a uma diminuição na liberação de dopamina na fenda sináptica (Robbins, 2002). Nossa hipótese baseava-se na premissa de que uma baixa atividade do sistema dopaminérgico pode ser responsável, ao menos em parte, pela alta esquiva da área central do CA. Assim, o tratamento crônico com o MFD deveria aumentar a esquiva de regiões aversivas dos testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade dos ratos LEW e SHR, ou ao menos dos ratos SHR, tornando-os semelhantes aos ratos LEW não tratados. Neste caso, pretendíamos simular farmacologicamente em ratos SHR o fenômeno que teria origem genética em ratos LEW.

Os resultados mostraram que os animais tratados com o MFD apresentaram, como esperado, menores níveis de locomoção central e total no CA quando comparados com os animais tratados com salina (Figura 23a). Esta redução, no entanto, não foi dependente da linhagem utilizada. A influência emocional do MFD foi específica no teste do CA (Figura 23a-b). Contudo, foi

observada uma tendência ( $p=0,08$ ) de redução do tempo gasto nos braços abertos do LCE em animais tratados com o MFD. A falta de efeito significativo do tratamento no teste de consumo de etanol sugere novamente que os mecanismos reguladores dos comportamentos emocionais no CA são diferentes daqueles envolvidos no consumo de etanol. Então, a provável redução na liberação de dopamina causada pelo tratamento crônico com o MPD, pode ter aumentado a esquia do centro do CA e dos braços abertos do LCE (em ambas as linhagens). Este resultado confirma nossa hipótese de que parte da aversão do centro do CA seja regulada por mecanismos dopaminérgicos, que, por sua vez, seriam mediados pelo gene *Snca* da  $\alpha$ -sinucleína.

Apesar dos resultados promissores com a  $\alpha$ -sinucleína, o nosso estudo de ligação (ver primeiro bloco experimental) sugere que ela esteja nos limites máximos do intervalo de confiança (portanto longe do pico) do QTL *Ofil1* encontrado para a locomoção central no CA (Figura 11). Todavia, podemos perceber que para a locomoção central no CA, parecem existir mais de um QTL ao longo do cromossomo 4, como visto pelos outros picos presentes na região analisada. Sabe-se que o mapeamento fino (de resolução entre 1 e 5cM) exige mais eventos de recombinação para separar os genes que governam os QTL ligados. Então, para verificar este ponto, nós utilizamos o teste para cálculo de intervalos de confiança (*bootstrap*) de QTL (Visscher *et al.*, 1996). Este teste confirma que podem existir outros dois diferentes QTL ligados neste mesmo cromossomo, sendo que apenas um deles alcançou o limite de significância (pico em D4MGH27; ver Tabela 9). Os outros dois foram apenas sugestivos (pico no D4RAT206 e pico no D4RAT164). Assim, apesar

da  $\alpha$ -sinucleína não estar mapeada exatamente na região do pico de *Ofil1* ela está localizada no intervalo entre dois QTL que afetam a locomoção central no CA. Conseqüentemente, caso seja confirmado que a  $\alpha$ -sinucleína não é um bom gene candidato para *Ofil1* ela pode, ainda, ser um bom gene candidato para explicar o QTL vizinho, menos significativo. Estratégias como a produção de linhagens sub-congênicas no intervalo genômico em questão, poderão, em breve, realmente responder se existem diferentes QTL ou genes ligados influenciando a locomoção central nestes animais.

## 6-CONCLUSÕES

Na primeira estratégia experimental, os resultados confirmaram que os ratos da linhagem LEW são, enquanto modelos experimentais, mais “ansiosos” e “depressivos” quando comparados com os ratos SHR, pois eles exploraram menos a área central do CA, os braços abertos do LCE, o compartimento luminoso da CBP e apresentaram maior imobilidade no TNF. Diversas evidências ao longo do trabalho sugeriram que os genes que regulam os comportamentos emocionais no CA e o consumo de etanol podem não ser os mesmos, ou apresentem apenas efeito parcial nas duas características. Nós demonstramos que *Ofil1* está presente nos machos das sub-linhagens LEW e SHR brasileiras, confirmando a importância desta região genômica na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade. Além disso, com o remapeamento, sugerimos que na verdade podem existir três diferentes QTL influenciando a locomoção central no cromossomo 4, sendo que o gene da  $\alpha$ -sinucleína está dentro do limite de confiança de *Ofil1*. Pela primeira vez no modelo genético LEW e SHR foram encontrados QTL para: defecação e locomoção periférica no CA; locomoção e tempo no compartimento branco da CBP e tempo no compartimento preto da CBP; e consumo de etanol forçado (10%) no cromossomo 4 do rato. Também foram encontrados seis QTL sugestivos em machos nos testes do CA, CBP, TNF e consumo de etanol. Em fêmeas, *Ofil1* parece ser influenciado por fatores ligados ao ciclo estral e, talvez, por esta razão, na primeira análise de QTL não foram encontrados QTL significativos, apenas 10 sugestivos. Entretanto, levando em conta a fase do ciclo estral, três QTL significativos foram encontrados em fêmeas: dois no

diestro-proestro para defecação no CA e locomoção no compartimento preto da CBP e um pleiotrópico no estro-metaestro influenciando tempo e locomoção no compartimento branco da CBP.

Na segunda estratégia experimental, os animais da linhagem LEW (considerados os mais “ansiosos”) tiveram maiores níveis de expressão do gene da  $\alpha$ -sinucleína (*Snca*), no hipocampo, quando comparados aos animais SHR. Um polimorfismo encontrado na posição +562 deste gene parece estar associado ao comportamento de aproximação do centro do CA. Por fim, o MFD aumentou a esquiva de ambas as linhagens do centro do CA, corroborando que uma baixa ativação do sistema dopaminérgico é, ao menos em parte, responsável por uma maior esquiva do centro do CA. Este resultado apóia farmacologicamente o possível papel da  $\alpha$ -sinucleína no comportamento diferencial entre as linhagens LEW e SHR no teste do CA.

Estudos futuros, como o aqui apresentado, aliados com experimentos farmacológicos, sem dúvida representarão uma importante contribuição ao conhecimento dos mecanismos neurobiológicos que modulam as diferentes dimensões da resposta emocional. Tais estudos poderão possibilitar o desenvolvimento de drogas com maior especificidade para os transtornos de ansiedade humana.

No futuro, devido ao acúmulo de dados gerados através das abordagens de QTL e de gene candidato, assim como das novas técnicas e recursos em desenvolvimento, identificaremos a função e as relações de diversos genes, assim como os RNAm e as proteínas envolvidas em um dado comportamento. Com certeza, isto proporcionará uma análise comportamental em um nível bastante avançado e o foco dos estudos deverá mudar da abordagem pontual

para as estratégias baseadas na análise das redes biológicas integradas formadas por genes, RNAm e proteínas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARIÑAS, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W.-H.; CASTILLO, P. E. *et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**, v. 25, p. 239-252, 2000.
- ADAMCZYK, A.; SOLECKA, J.; STROSZNAJDER, J. B. Expression of alpha-synuclein in different brain parts of adult and aged rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, p. 29-37, 2005.
- ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 721-744, 2001.
- ALLAN, C. A. Alcohol problems and anxiety disorders – a critical review. **Alcohol Alcohol**, v. 30, p. 145-151, 1995.
- ALMEIDA, O. F. X.; SHOAIB, M.; DEIKE, J.; FISCHER, D.; DARWISH, M. H.; PATCHEV V. K. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. **The J Cli Invest**, v. 101, p. 2677-2685, 1998.
- ÁLVARO, G.; DI FABIO, R. Neurokinin 1 receptor antagonists-current prospects. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 10, p. 613-621, 2007.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; CRASKE, M. G.; FANSELOW, M. S. Anxiety: at the intersection of genes and experience. **Nature Neurosci**, v. 2, p. 780-782, 1999.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlorodiazepoxide on open field behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, p. 387-397, 1998.
- ANISMAN, H.; MERALI, Z.; STEAD, J. D.H. Experiential and genetic contributions to depressive- and anxiety-like disorders: Clinical and experimental studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, p. 1185–1206, 2008.

- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ARMARIO, A.; GAVALDÀ, A.; MARTI, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. **Psychoneuroendocrinol**, v. 20, p. 879-890, 1995.
- BADENHOP, R. F.; MOSES, M. J.; SCIMONE, A.; MITCHELL, P. B.; EWENWHITE, K. R.; ROSSO, A.; DONALD, J. A.; ADAMS, L. J.; SCHOFIELD, P. R. A genome screen of 13 bipolar affective disorder pedigrees provides evidence for susceptibility loci on chromosome 3 as well as chromosomes 9, 13 and 19. **Mol Psychiatry**, v. 7, p. 851–859, 2002.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE B. K.; BAST, T. *et al.* Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 273-283, 2004.
- BAO, A.-M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D. F. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. **Brain Res Rev**, v. 57, p. 531-553, 2008.
- BARDEN, N.; REUL, J. M. H. M.; HOLSBOER, F. Do antidepressants stabilize mood through actions on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system? **TINS**, v. 18, p. 6-11, 1995.
- BECK, K. D.; LUINE, V. N. Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: Role of housing conditions. **Physiol Behav**, v. 75, p. 661– 673, 2002.
- BEKKER, M. H. J.; MENS-VERHULST, J. V. Anxiety Disorders: Sex Differences in Prevalence, Degree, and Background, But Gender-Neutral Treatment. **Gender Medicine**, v. 4, suppl.B, 2007.
- BELKNAP, J.K.; ATKINS, A.L. The replicability of QTLs for murine alcohol preference drinking behavior across eight independent studies. **Mamm Genome**, v. 12, p. 893–899, 2001.
- BELL, R. L.; RODD, Z. A.; LUMENG, L.; MURPHY, J. M.; MCBRIDE, W. J. The

- alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. **Addict Biol**, v. 11, p. 270-288, 2006b.
- BELL, R. L.; RODD, Z. A.; SABLE, H. J.; SCHULTZ, J. A.; HSU, C. C. *et al.* Daily patterns of ethanol drinking in peri-adolescent and adult alcohol-preferring (P) rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, p. 35-46, 2006a.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res**, v. 125, p. 141-149, 2001.
- BICE, P.; FOROUD, T.; BO, R.; CASTELLUCCIO, P.; LUMENG, L.; LI, T. K.; CARR, L. G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mamm Genome**, v. 9, p. 949-955, 1998.
- BICE, P.; FOROUD, T.; CARR, L. G.; ZHANG, L.; LIU, L.; GRAHAME, N. J.; LUMENG, L.; LI, T.-K.; BELKNAP, J. K. Identification of QTLs Influencing Alcohol Preference in the High Alcohol Preferring (HAP) and Low Alcohol Preferring (LAP) Mouse Lines. **Behav Genet**, v. 36, p. 248-60, 2006.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 205-218, 2001a.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; WEISS, S. M.; MEYER, S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 35, p. 775-780, 1990.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiol Behav**, v. 73, p. 261-271, 2001b.
- BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing Antidepressant activity? **Psychopharmacologia**, v. 94, p. 147-160, 1988.
- BRADY, K. T.; SONNE, S. C. The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse. **Alcohol Res Health**, v. 23, p. 263-271, 1999.

- BRIMBERG, L; FLAISHER-GRINBERG, S.; SCHILMAN, E. A.; JOEL, D. Strain differences in 'compulsive' lever-pressing. **Behav Brain Res**, v. 179, p. 141–151, 2007.
- BROADHURST, P. L. The Maudsley Reactive and Nonreactive strains of rats, a survey. **Behav Genet**, v. 5, p. 299-319, 1975.
- BRUSH, F. R., GENDRON, C. M.; ISAACSON, M. D. A selective genetic analysis of the Syracuse high- and low-avoidance (SHA/Bru and SLA/Bru) strains of rats (*Rattus norvegicus*). **Behav Brain Res**, v. 106, p. 1-11, 1999.
- BUNKER, S. J.; COLQUHOUN, D. M; ESLER, M. D; HICKIE, I. B.; HUNT, D. V; JELINEK, M.; OLDENBURG, B. F.; PEACH, H. G.; RUTH, D.; TENNANT , C. C.; TONKIN, A. M. "Stress" and coronary heart disease: psychosocial risk factors. **Med J Aust**, v. 178, p. 272-276, 2003.
- CAILHOL, S.; MORMÈDE, P. Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences. **J Stud Alcohol**, suppl 63, p. 91-99, 2002.
- CAILHOL, S.; MORMÈDE, P. Sex and strain differences in ethanol drinking: effects of gonadectomy. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, p. 594-599, 2001.
- CALDARONE, B.; SAAVEDRA, C.; TARTAGLIA, K.; WEHNER, J. M.; DUDEK, B. C.; FLAHERTY, L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nat Genet**, v. 17, p. 335-337, 1997.
- CALOGERO, A. E.; STERNBERG, E. M.; BAGDY, G.; SMITH, C.; BERNARDI, R.; AKSENTIJEVICH, S.; WILDER, R. L.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats, in vivo and invitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of Corticotropin-Releasing Hormone. **Neuroendocrinol**, v. 55, p. 600-608, 1992.
- CAPPELL, H.; HERMAN, C. P. Alcohol and tension reduction: a review. **Q J Stud Alcohol**, v. 33, p. 33-64, 1972.

- CARDOSO, B. M.; SANT'ANNA, M. K.; DIAS, V. V.; ANDREAZZA, A. C.; CERESÉR, K. M.; KAPCZINSKI, F. The impact of co-morbid alcohol use disorder in bipolar patients. **Alcohol**, v. 42, p. 451-457, 2008.
- CARR, L. G.; FOROUD, T.; BICE, P.; GOBBETT, T.; IVASHINA, J.; EDENBERG, H.; LUMENG, L.; LI, T.-K. A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, p. 884-887, 1998.
- CASPI, A.; MOFFITT, T. E. Gene–environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. **Nature Rev Neurosci**, v. 7, p. 583-590, 2006.
- CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T. E.; TAYLOR, A.; CRAIG, I. W.; HARRINGTON, H.; MCCLAY, J.; MILL, J.; MARTIN, J. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, v. 301, p. 386-389, 2003.
- CASTANON, N.; MORMÈDE, P. Psychobiogenetics, adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. **Psychoneuroendocrinol**, v. 19, p. 257- 282, 1994.
- CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res**, v. 85, p. 27-35, 1997.
- CHESLER, E. J.; LU, L.; SHOU, S.; QU, Y.; GU, J.; WANG, J.; HSU, H. C.; MOUNTZ, J. D.; BALDWIN, N. E.; LANGSTON, M. A.; THREADGILL, D. W.; MANLY, K. F.; WILLIAMS, R. W. Complex trait analysis of gene expression uncovers polygenic and pleiotropic networks that modulate nervous system function. **Nat Genet**, v. 37, p. 233–242, 2005.
- CHESLER, E. J.; WILSON, S. G.; LARIVIERE, W. R.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; MOGIL, J. S. Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via

- computacional analysis of a large data archive. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 907-923, 2002.
- CHIAVEGATTO, S.; IZIDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T. A.; TORRÃO, A. S.; CONCEIÇÃO, I. M.; BRITTO L. R.; RAMOS A. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Mol Psychiatry**, in print.
- CLARKE, T.-K.; TREUTLEIN, J.; ZIMMERMANN, U. S.; KIEFER, F.; SKOWRONEK, M. H.; RIETSCHEL, M.; MANN, K.; SCHUMANN, G. HPA-axis activity in alcoholism: examples for a gene–environment interaction. **Addict Biol**, v. 13, p. 1–14, 2008.
- CLÉMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: A critical review. **Brain Res Bull**, v. 57, p. 57–71, 2002.
- CLONINGER, C. R. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. **Science**, v. 236, p. 410-416, 1987.
- COLOMBO, G.; AGABIO, R.; LOBINA, C.; REALI, L.; ZOCCHI, A.; FADDA, F.; GESSA, G. L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. **Physiol Behav**, v. 57, p. 1181-1185, 1995.
- COMPLEX TRAIT CONSORTIUM. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nature Rev Genet**, v. 4, p. 911-916, 2003.
- CONGER, J. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. **Q J Stud Alcohol**, v. 17, p. 296-305, 1956.
- CONTRERAS, C. M.; MARTINEZ-MOTA, L.; SAAVEDRA, M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 22, p. 1121-1128, 1998.
- CORNELIUS, J. R.; BUKSTEIN, O.; SALLOUM, I.; CLARK, D. Alcohol and psychiatric comorbidity. **Recent Dev Alcohol**, v. 16, p. 361-374, 2003.

- COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of Mice in a Black and White Test Box: Validation as a Model of Anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 32, p. 777-785, 1989.
- COX, B. J., SWINSON, R. P., SHULMAN, I. D., KUCH, K., & REICHMAN, J. T. Gender effects and alcohol use in panic disorder with agoraphobia. **Behav Res Ther**, v. 31, p. 413–416, 1993.
- CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. **Science**, v. 284, p. 1670-1672, 1999.
- CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic Specificity of a Simple Animal Model for the Behavioral Actions of Benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 15, p. 695-699, 1981.
- CRAWLEY, J. N.; DAVIS, L. G. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. **Brain Res Bull**, v. 8, p. 609-612, 1982.
- CRAWLEY, J. N.; PAYLOR, R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. **Horm Behav**, v. 31, p. 197–211, 1997.
- CRUSIO, W. E. A note on the effect of within-strain sample sizes on QTL mapping in recombinant inbred strain studies. **Genes Brain Behav**, v. 3, p. 249–251, 2004.
- CRUZ, A. P. M. FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, p. 171-176, 1994.
- CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 571–625, 2005.

- DA SILVA, G. E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Braz J Biol**, v. 37, p. 1511-1517, 2004.
- DA SILVA, G. E.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 77, p. 693-706, 2005.
- DARBRA, S.; PRAT, G.; PALLARÉS, M.; FERRE, N. Tolerance and sensitization to the hypnotic effects of alcohol induced by chronic voluntary alcohol intake in rats. **J Psychopharmacol**, v. 16, p. 79-83, 2002.
- DAWSON, D. A.; GRANT, B. F.; RUAN, W. J. The association between stress and drinking: modifying effects of gender and vulnerability. **Alcohol & Alcoholism**, v. 40, p. 453-460, 2005.
- DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol Sci**, v. 16, p. 33-36, 1995.
- DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS 4th edn (American Psychiatric Association Washington DC. 1994).
- DÍAZ-VÉLIZ, G.; ALARCÓN, T.; ESPINOZA, C.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, p. 637-642, 1997.
- DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 597-609, 2001.

- DIPETRILLO, K.; WANG, X.; STYLIANOU, I. M.; PAIGEN, B. Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. **Trends genet**, v. 21, p. 683-692, 2005.
- DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and Antidepressants. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 1136–1143, 2006.
- DRISCOLL, P.; ESCORIHUELA, R. M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIORGI, O.; SCHWEGLER, H.; STEIMER, T.; WIERSMA, A.; CORDA, M. G.; FLINT, J.; KOOLHAAS, J. M.; LANGHANS, W.; SCHULZ, P. E.; SIEGEL, J.; TOBEÑA A. Genetic selection and differential stress responses: the Roman lines/strains of rats. **Ann NY Acad Sci**, v. 851, p. 501-510, 1998.
- EHLERT, U.; GAAB, J.; HEINRICHS, M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Biol Psychol**, v. 57, p. 141-152, 2001.
- ESSAU, C. A.; CONRADT, J.; PETERMANN, F. Frequency, comorbidity, and psychosocial impairment of anxiety. **J Anxiety Disord**, v. 14, p. 263-279, 2000.
- FERNANDEZ-TERUEL, A.; DRISCOLL, P.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBENA, A.; ESCORIHUELA, R. M. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, p. 225-231, 2002.
- FILE, S. E. Animal models of different anxiety states. In *Neurobiology to treatment* editado por Biggio, G.; Sanna, E.; Costa, E. Raven Press. Nova York, 1995.
- FILE, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin<sub>1</sub> receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, p. 747-752, 1997.

- FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 125, p. 151-157, 2001.
- FILE, S. E. The biological basis of anxiety. In: Meltzer, h. y. & Nerozzi (eds). Current practices and future developments in the pharmacotherapy of mental disorders. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 159-165, 1991.
- FILE, S. E. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 877-886, 1987.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **Br J Pharmacol**, v. 62, p. 19-24, 1978.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. JR.; ANDREWS, N. Social interaction and elevated plus-maze tests: Changes in release and uptake of 5-HT and GABA. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 217-221, 1993.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. JR.; ANDREWS, N. Social interaction and elevated plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 217-221, 1993.
- FLINT J. Analysis of Quantitative Trait Loci That Influence Animal Behavior. **J Neurobiol**, v. 54, p. 46-77, 2003.
- FLINT, J.; CORLEY, R.; DEFRIES, J. C; FULKER, D. W.; GRAY, J. A.; MILLER, S.; COLLINS, A. C. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. **Science**, v. 269, p. 1432-1435.
- FLINT, J.; VALDAR, W.; SHIFMAN, S.; MOTT, R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. **Nature Rev Genet**, v. 6, p. 271-286, 2005.
- FRACKIEWICZ, E. J. ; SRAMEK, J. J. ; CUTLER, N. R. Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. **Ann Pharmacother**, v. 34, p. 80-88, 2000.
- FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in

- hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, p. 587-596, 2000.
- FRYE, C. A.; WALF, A. A. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. **Horm Behav**, v. 41, p. 306-315, 2002.
- FUJITA, O.; ANNEN, Y.; KITAOKA, A. Tsukuba high- and low-emotional strains of rats (*Rattus norvegicus*): an overview. **Behav Genet**, v. 24, p. 389-415, 1994.
- FULLERTON, J. M.; WILLIS-OWEN, S. A.G.; YALCIN, B.; SHIFMAN, S.; COPLEY, R. R.; MILLER, S. R.; BHOMRA, A.; DAVIDSON, S.; OLIVER, P. L.; MOTT, R.; FLINT, J. Human-Mouse Quantitative Trait Locus Concordance and the Dissection of a Human Neuroticism Locus. **Biol Psychiatry**, v. 63, p. 874–883, 2008.
- GELERNTER, J.; BONVICINI, K.; PAGE, G.; WOODS, S. W.; GODDARD, A. W.; KRUGER, S.; PAULS, D. L.; GOODSON S. Linkage genome scan for loci predisposing to panic disorder or agoraphobia. **Am J Med Genet**, v. 105, p. 548-557, 2001.
- GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Open field and elevated plus-maze, a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behav Brain Res**, v. 25, p. 101-107, 1987.
- GEORGE, S.; BUUSE, M. V. D.; MOK, S. S.; MASTERS, C. L.; LI, Q-X; CULVENOR, J. G.  $\alpha$ -Synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. **Exp Neurol**, v. 210, p. 788–792, 2008.
- GLOWA, J. R.; HANSEN, C. T. Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains. **Behav Genet**, v. 24, p. 79-84, 1994.
- GOLDSTEIN, D. S. Catecholamines and stress. **Endocr Regul**, v. 37, p. 69-80, 2003.

- GOMEZ, C.; SALDIVAR-GONZALEZ, A.; DELGADO, G.; RODRIGUEZ, R.  
Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats.  
**Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, p. 543-550, 2002.
- GORDON, J. A.; HEN, R. Genetic approaches to the study of anxiety. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 193–222, 2004.
- GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; GUIMARÃES, F. S.; VIANA, G. S. B.;  
VIANA, M. B. Neurobiologia das doenças mentais, 5a. ed., São Paulo,  
Lemos Editorial; 1999.
- GRANT, B. F.; HARFORD T. C. Comorbidity between DSM-IV alcohol use  
disorders and major depression: results of a national survey. **Drug Alcohol Depend**, v. 39, p. 197-206, 1995.
- GRANT, B. F.; STINSON, F. S.; DAWSON, D. A.; CHOU, S. P.; DUFOUR, M.  
C.; COMPTON, W.; PICKERING, R. P.; KAPLAN, K. Prevalence and co-  
occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety  
disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and  
Related Conditions. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, p. 807-816, 2004.
- GRAY, J. A. Emotionality in male and female rodents, a reply to Archer. **Br J Psychol**, v. 70, p. 425-440, 1979.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry  
into the Functions of the Septo-hippocampal System. Oxford University  
Press: Oxford, 2000.
- GRAY, P.; COONEY, J. Stress-induced responses and open-field behavior in  
estrous and nonestrous mice. **Physiol Behav**, v. 29, p. 287–92, 1982.
- GREELEY, J.; OEI, T. Alcohol and tension reduction. In Psychological theories  
of drinking and alcoholism, K. E. Leonard, and H. T. Blane, eds. (New York:  
Guilford Press), pp. 14-53. 1999.

- GREENBERG, P. E.; KESSLER, R. C.; BIRNBAUM, H. G.; LEONG, S. A.; LOWE, S. W.; BERGLUND, P. A.; COREY-LISLE, P. K. The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? **J Clin Psychiatry**, v. 64, p. 1465-1475, 2003.
- GREENBERG, P. E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R. C.; FINKELSTEIN, S. N.; BERNDT, E. R.; DAVIDSON, J. R.; BALLENGER, J. C.; FYER, A. J. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. **J Clin Psychiatry**, v. 60, p. 427-435, 1999.
- GREGORY, S. G.; SEKHON, M.; SCHELN, J.; ZHAO, S.; OSOEGAWA, K.; SCOTT, C. E.; EVANS, R. S.; BURRLDGE, P. W.; COX, T. V.; FOX, C. A.; HUTTON, R. D.; MULLENGER, I. R.; PHILLIPS, K. J.; SMITH, J.; STALKER, J.; THREADGOLD, G. J.; BARNEY, E.; WYLLE, K.; CNIWALLA, A.; WALLS, J.; *et al.* A physical map of the mouse genome. **Nature**, v. 418, p. 743-750, 2002.
- GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Rev Neurosci**, v. 5, p. 545-551, 2004.
- GUILLOT, P.-V.; CHAPOUTIER, G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. **Behav Brain Res**, v. 77, p. 211-213, 1996.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. L., Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **J Comp Psychol**, v. 18, p. 385-403, 1934.
- HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J Pharmacol Toxicol Meth**, v. 29, p. 129-138, 1993.
- HARFORD, T. C.; PARKER, D. A.; GRANT, B. F.; DAWSON, D. A. Alcohol use and dependence among employed men and women in the United States in 1998. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 16, p. 146-148, 1998.

- HASENÖHRL, R.U.; JENTJENS, O.; SILVA, A. S.; TOMAZ, C.; HUSTON, J. P. Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **Eur J Pharmacol**, v. 354, p. 123–133, 1998.
- HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wörthsee: BioMed Verlag, 1986.
- HEILIG, M.; KOOB, G. F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. **Trends Neurosci**, v. 30, p. 399-406, 2007.
- HENDERSON, N. D.; TURRI, M. G.; DEFRIES, J. C.; FLINT, J. QTL Analysis of Multiple Behavioral Measures of Anxiety in Mice. **Behav Genet**, v. 34, p. 267-293, 2004.
- HENDLEY, E. D.; OHLSSON, W. G. Two new inbred rat strains derived from SHR, WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. **Am J Physiol**, v. 261, p. H583- H589, 1991.
- HENNIGER, M. S.; SPANAGEL, R.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; HOLTER, S. M. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 729-736, 2002.
- HENRY, B.; VALE, W.; MARKOU, A. The Effect of Lateral Septum Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Activation on Anxiety Is Modulated by Stress. **J Neurosci**, v. 26, p. 9142–9152, 2006.
- HINOJOSA, F. R.; SPRICIGO JR, L.; IZIDIO, G. S.; BRUSKE, G. R.; LOPES, D. M.; RAMOS A. Evaluation of two genetic animal models in behavioural tests of anxiety and depression. **Behav Brain Res**, v. 1681, p. 27–136, 2006.

- HISHIGAKI, H.; TSUJI, A.; BROWNE, J.; YAMASAKI, Y.; MIZOGUCHI-MIYAKITA, A.; OGA, K.; *et al.* A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. **Nature Genet**, v. 22, p. 27-36, 1999.
- HITZEMANN, R.; EDMUNDS, S.; WU, W.; MALMANGER, B.; WALTER, N.; BELKNAP, J.; DARAKJIAN, P.; MCWEENEY, S. Detection of reciprocal quantitative trait loci for acute ethanol withdrawal and ethanol consumption in heterogeneous stock mice. **Psychopharmacology**, in print.
- HOAR WS, HICKMAN CP, editors (1975). A laboratory companion for general and comparative physiology. 2nd ed. New Jersey, USA: Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- HOLSBOER, F. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 477-501, 2000.
- HOYNE, G. F.; GOODNOW, C. C. The use of genomewide ENU mutagenesis screens to unravel complex mammalian traits: identifying genes that regulate organ-specific and systemic autoimmunity. **Immunol Rev**, v. 210, p. 27–39, 2006.
- HUNTER, D. J. Gene–environment interactions in human diseases. **Nature Rev Genet**, v. 6, p. 287-298, 2005.
- IZIDIO, G. S.; LOPES, D. M.; SPRICIGO JR, L.; RAMOS A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes Brain Behav**, v. 4, p. 412-419, 2005b.
- IZIDIO, G. S.; RAMOS, A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol**, v. 41, p. 517-524, 2007.
- IZIDIO, G. S.; SPRICIGO JR, L.; RAMOS A. Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus. **Behav Processes**, v. 68, p. 129-134, 2005a.
- JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety.

- Physiol Behav**, v. 49, p. 245-250, 1991.
- JURUENA, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, p. 189-201, 2004.
- KAJANTIE, E.; PHILLIPS, D. I. W. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinol**, v. 31, p. 151–178, 2006.
- KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism**, v. 54, p. 24– 27, 2005.
- KALISCH, R.; SCHUBERT, M.; JACOB, W.; KESSLER, M. S.; HEMAUER, R.; WIGGER, A.; *et al.* Anxiety and hippocampus volume in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 925-932, 2006.
- KALUEFF, A. V.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; SUFKA, K. Hybridizing behavioral models: a possible solution to some problems in neurophenotyping research? **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 32, p. 1172-1178, 2008.
- KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, p. 3095-3105, 2003.
- KESSLER, R.; CRUM, R.; WARNER, L.; NELSON, C.; SCHULENBERG, J.; ANTHONY, J. Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the National Comorbidity Survey. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, p. 313–321, 1997.

- KHANNA, J. M.; KALANT, H.; CHAU, A. K.; SHARMA, H. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. **Psychopharmacology (Berl.)** v.101, p. 390-395, 1990.
- KIRBY, R. F.; CALLAHAN, M. F.; MCCARTY, R.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular and sympathetic nervous system responses to an acute stressor in Borderline Hypertensive Rats (BHR). **Physiol Behav**, v. 46, p. 309-313, 1989.
- KONSTANTINOS A. P.; SHERIDAN, J. F. Stress and influenza viral infection: modulation of proinflammatory cytokine responses in the lung. [Respir Physiol](#), v. 128, p. 71-77, 2001.
- KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, p. 52-58, 1997.
- KOSTEN, T. A.; MISERENDINO, M. J. D.; CHI, S.; NESTLER, E. J. Fischer and Lewis rat strain show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 269, p. 137-144, 1994.
- KOVÁCS, P.; VOIGT, B.; KLÖTING, I. Alleles of the spontaneously hypertensive rat decrease blood pressure at loci on chromosomes 4 and 13. **Biochem Biophys Res Com**, v. 238, p. 586-589. 1997.
- KRAMER, M. S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J.; SRAMEK, J. J.; REINES, S. A.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT-KNOWLES, E.; HALE, J. J.; MILLS, S. G.; MACCOSS, M.; SWAIN, C.J.; HARRISON, T.; HILL, R. G.; HEFTI, F.; SCOLNICK, E. M.; CASCLERI, M. A.; CHICCHI, G. G.; SADOWSKI, S.; WILLIAMS, A. R.; HEWSON, L.; SMITH, D.; CARLSON, E. J.; HARGREAVES, R. J.; RUPNIAK, N. M. J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, v. 281, p. 1640-1645, 1998.

- KUDIELKA, B. M.; BUSKE-KIRSCHBAUM, A.; HELLHAMMER, D. H.; KIRSCHBAUM, C. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, p. 83–98, 2004.
- KUSHNER, M. G., SHER, K. J., WOOD, M. D., & WOOD, P. K. Anxiety and drinking behavior: Moderating effects of tension-reduction alcohol outcome expectancies. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 18, p. 852–860, 1994.
- KUSHNER, M. G.; MACKENZIE, T. B.; FISZDON, J.; VALENTINER, D. P.; FOA, E.; ANDERSON, N.; WANGENSTEEN, D. The effects of alcohol consumption on laboratory-induced panic and state anxiety. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, p. 264–270, 1996.
- LAHMAME, A.; ARMARIO, A. Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test, are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 123, p. 191-198, 1996.
- LANDER, E.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nature Genet**, v. 11, p. 241-247, 1995.
- LANDGRAF, R.; WIGGER, A. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. **Stress**, v. 6, p. 111-119, 2003.
- LANFUMEY, L.; MONGEAU, R.; COHEN-SALMON, C.; HAMON, M. Corticosteroid–serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neurosci Biobeh Rev**, v. 32, p. 174–1184, 2008.
- LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **J Affect Disord**, v. 61, p. 137-159, 2000.
- LE NICULESCU, H.; MCFARLAND, M. J.; MAMIDIPALLI, S.; OGDEN, C. A.; KUCZENSKI, R.; KURIAN, S. M.; SALOMON, D. R.; TSUANG, M. T.;

- NURNBERGER JR. J. I.; NICULESCU, A. B. Convergent functional genomics of bipolar disorder: from animal model pharmacogenomics to human genetics and biomarkers. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 31, p. 897–903, 2007.
- LEE, C.; RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 102, p. 507-513, 1990.
- LEONARDO, E. D.; HEN, R. Genetics of affective and anxiety disorders. **Annu Rev Psychol**, v. 57, p. 117-137, 2006.
- LETWIN, N. E.; KAFKAFI, N.; BENJAMINI, Y.;MAYO, C.; FRANK, B. C.; LUU, T.; LEE,N. H.; ELMER, G. I. Combined application of behavior genetics and microarray analysis to identify regional expression themes and gene-behavior associations. **J. Neurosci**, v. 26, p. 5277–5287, 2006.
- LI, T.-K.; HEWITT, B. G.; GRANT, B. F. Alcohol use disorders and mood disorders: A national institute on alcohol abuse and alcoholism perspective. **Biol Psychiatry**, v. 56, p. 718-720, 2004.
- LIANG, T,; CARR, L. G. Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-preferring and -non preferring rats. **J Neurochem**, v. 99, p. 470-482, 2006.
- LIANG, T.; SPENCE, J.; LIU, L.; STROTHER, W. N.; CHANG, H. W.; ELLISON, J. A.; LUMENG, L.; LI, T.-K.; FOROUD, T.; CARR, L. G.  $\alpha$ -Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and-nonpreferring rats. **PNAS**, v. 100, p. 4690-4695, 2003.
- LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behav Brain Res**, v. 94, p. 301-310, 1998.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, p. 321-340, 1990.

- LLAMAS B.; CONTESSE, V.; GUYONNET-DUPERAT, V.; VAUDRY, H. ;  
MORMÈDE, P. ; MOISAN, M. P. QTL mapping for traits associated with  
stress neuroendocrine reactivity in rats. **Mamm Genome**, v. 16, p. 505-515.  
2005.
- LÖFGREN, M.; JOHANSSON, I. M.; MEYERSON, B.; LUNDGREN, P.;  
BÄCKSTRÖM, T. Progesterone withdrawal effects in the open field test can  
be predicted by elevated plus maze performance. **Horm Behav**, v. 50, p.  
208-215, 2006.
- LUINE, V. N.; BECK, K. D.; BOWMAN, R. E.; FRANKFURT, M.; MACLUSKY,  
N. J. Chronic Stress and Neural Function: Accounting for Sex and Age. **J  
Neuroendocrinol**, v. 19, 743–751.
- MADSEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C. J.; KAO, D. J.; DEBRY, R. W.;  
ADKINS, R.; AMRINE, H. M.; STANHOPE, M. J.; DE LONG, W. W.;  
SPRINGER, M. S. Parallel adaptative radiations in two major clades of  
placental mammals. **Nature**, v. 409, p. 610-614, 2001.
- MAGUIRE, J. L.; STELL, B. M.; RAFIZADEH, M.; MODY, I. Ovarian cycle-linked  
changes in GABA-A receptors mediating tonic inhibition alter seizure  
susceptibility and anxiety. **Nature Neurosci**, v.8, p. 797–804, 2005.
- MANLY, B. F. J. *Multivariate Statistical Methods: a Primer*. Chapman and Hall,  
London, 159 pp. 1988.
- MARCONDES, F. K. ; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the  
estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**, v.  
62, p. 609-614, 2002.
- MARINELLI, P. W.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C. Estradiol valerate and  
alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the  
putative role of endorphins. **Behav Brain Res**, v. 139, p. 59-67, 2003.
- MASLIAH, E.; ROCKSTEIN, E.; VEINBERGS, I.; MALLORY, M.; HASHIMOTO,  
M.; TAKEDA, A. ET AL. Dopaminergic loss and inclusion body formation in

- alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. **Science**, v. 287, p. 1265-1269, 2000.
- MASSION, A. O.; WARSHAW, M. G.; KELLER, M. B. Quality of life and psychiatric morbidity in panic disorder and generalized anxiety disorder. **Am J Psychiatry** v. 150, p. 600-607, 1993.
- MATHIS, C.; PAUL, S. M.; CRAWLEY, J. N. Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. **Behav Genet**, v. 24, p. 171-180, 1994.
- MAZZUCCO, C. A.; WALKER, H. A.; PAWLUSKI, J. L.; LIEBLICH, S. E.; GALEA, L. A.M. ER $\alpha$ , but not ER $\beta$ , mediates the expression of sexual behavior in the female rat. **Behav Brain Res**, v. 191, p. 111–117, 2008.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. The  $\alpha$ -synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease. **Exp Neurol**, v. 212, p. 235–238, 2008.
- MCQUAID, J. R.; STEINA, M. B.; LAFFAYEA, C.; MCCAHILL, M. E. Depression in a Primary Care Clinic: the Prevalence and Impact of an Unrecognized Disorder. **J Affect Disord**, v. 55, p. 1–10, 1999.
- MERALI, Z.; LEVAC, C.; ANISMAN, H. Validation of a simple, Ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. **Biol Psychiatry**, v. 54, p. 552-565, 2003.
- MERIKANGAS, K. R.; ANGST, J.; EATON, W.; CANINO, G.; RUBIO-STIPEC, M.; WACKER, H.; WITTCHEN, H.; ANDRADE, L.; ESSAU, C.; KRAEMER, H.; ROBINS, L.; KUPFER, D. Comorbidity and boundaries of affective disorders with anxiety disorders and substance misuse: Results of an international task force. **B J Psychiatry**, v. 168, p. 58–67, 1996.
- MERIKANGAS, K. R.; GELERNTER, C. S. Co-morbidity for alcoholism and depression. *Psychiatric Clinics of North America*. 1990.

MERIKANGAS, K.; SWENDSEN, J. The genetic epidemiology of psychiatric disorders. **Epidemiol Rev**, v. 19, p. 1–12, 1997.

MEYER-LINDENBERG, A.; WEINBERGER, D. R. Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. **Nature Neurosci**, v. 7, p. 818-827, 2006.

MEZIANE, H.; OUAGAZZAL, A.-M; AUBERT†, L.; WIETRZYCH, M.; KREZEL, W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping Strategies. **Genes Brain Behav**, v. 6, p. 192–200, 2007.

MICHAELIS. 1998-2009 Editora Melhoramentos Ltda.  
<http://michaelis.uol.com.br/>

MIDDELDORP, C. M.; HOTTENGA, J.-J.; SLAGBOOM, P. E.; SULLIVAN, P. F.; DE GEUS, E. J. C.; POSTHUMA, D.; WILLEMSSEN, G.; BOOMSMA, D. I. Linkage on chromosome 14 in a genome-wide linkage study of a broad anxiety phenotype. **Mol Psychiatry**, v. 13, p. 84–89, 2008.

MOGIL, J. S.; RICHARDS, S. P.; O'TOOLE, L. A.; HELMS, M. L.; MITCHELL, S. R.; KEST, B.; *et al.* Identification of a sex-specific quantitative trait locus mediating nonopioid stress-induced analgesia in female mice. **J Neurosci**, v. 17, p. 7995–8002, 1997.

MOGIL, J. S.; CHESLER, E. J.; WILSON, S. G.; JURASKA, J. M.; STERNBERG, W. F. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, p. 375–89, 2000.

MOISAN, MARIE-PIERRE; COURVOISIER, H., BIHOREAU, MARIE-THERESE; GAUGUIER, D.; HENDLEY, E. D.; LATHROP, M.; JAMES, M. R.; MORMÈDE, P. A major quantitative trait locus influences hyperactivity in the WKHA rat. **Nature Genet**, v. 14, p. 471-473, 1996.

- MOISAN, M-P.; LLAMAS, B.; COOK, M. N.; MORMÈDE, P. Further dissection of a genomic locus associated with behavioral activity in the Wistar–Kyoto hyperactive rat, an animal model of hyperkinesis. **Mol Psychiatry**, 2002.
- MÖLLER, C.; WIKLUND, L.; SOMMER, W.; THORSELL, A.; HEILIG, M. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. **Brain Res**, v. 760, p. 94-101, 1997.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, p. 254-260, 1955.
- MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DIAZ-VELIZ, G. Effects of the Estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinol**, v. 21, p. 609-620, 1996.
- MORI, F.; TANJI, K.; YOSHIMOTO, M.; TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. **Brain Res**, v. 941, p. 118-126, 2002.
- MORMÈDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M. P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes Brain Behav**, v. 1, p. 111-116, 2002.
- MORMÈDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M. P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes Brain Behav**, v. 1, p. 111-116, 2002.
- MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E.; ZHANG, Y. P.; RYDER, O. A.; O'BRIEN, S. J. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, v. 409, p. 614-618, 2001.

- NADEAU, J. H. *Rattus norvegicus* and the industrial revolution. **Nat Genet**, v. 22, p. 3-4, 1999.
- NASCIMENTO HÄCKL, L. P.; CAROBREZ, A. P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 88, p. 177-185, 2007.
- NASH, M. W.; HUEZO-DIAZ, P.; WILLIAMSON, R. J.; STERNE, A.; PURCELL, S.; HODA, F.; CHERNY, S. S.; ABECASIS, G. R.; PRINCE, M.; GRAY, J. A.; BALL, D.; ASHERSON, P.; MANN, A.; GOLDBERG, D.; MCGUFFIN1, P.; FARMER1, A.; PLOMIN1, R.; CRAIG1, I. W.; SHAM, P. C. Genome-wide linkage analysis of a composite index of neuroticism and mood-related scales in extreme selected sibships. **Hum Mol Genet**, v. 13, p. 2173–2182, 2004.
- NAZAR, M.; JESSA, M.; PLAZNIK, A. Benzodiazepine-GABA<sub>A</sub> receptor complex ligands in two models of anxiety. **J Neural Transm**, v. 104, p. 733-746, 1997.
- NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**, v. 1, p. 336, 1996.
- NIKOLAUS, S.; HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R. U. The neurokinin-1 receptor antagonist WIN51,708 attenuates the anxiolytic-like effects of ventrapallidal substance P injection. **NeuroReport**, v. 10, p. 2293-2296, 1999.
- NURNBERGER, J. I.; FOROUD, T.; FLURY, L.; SU, J.; MEYER, E. T.; HU, K.; CROWE, R.; EDENBERG, H.; GOATE, A.; BIERUT, L.; REICH, T.; SCHUCKIT, M.; REICH, W. Evidence for a Locus on Chromosome 1 That Influences Vulnerability to Alcoholism and Affective Disorder. **Am J Psychiatry**, v. 158, p. 718–724, 2001.
- NURNBERGER, J. I.; WIEGAND, R.; BUCHOLZ, K.; O'CONNOR, SEA.;

- MEYER, E. T.; REICH, T.; RICE, J.; SCHUCKIT, M.; KING, L.; PETTI, T.; BIERUT, L.; HINRICHS, A. L.; KUPERMAN, S.; HESSELBROCK, V.; PORJESZ, B. A Family Study of Alcohol Dependence. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, 2004.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-293, 1963.
- OKUDA, T.; SUMIYA, T.; IWAI, N.; MIYATA, T. Difference of gene expression profiles in spontaneous hypertensive rats and Wistar–Kyoto rats from two sources. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, p. 537–543, 2002.
- OSSENKOPP, K. P.; SORENSON, L.; MAZMANIAN, D. S. Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set. **Behav Proc**, v. 31, p. 129-144, 1994.
- PALANZA, P.; GIOIOSA, L.; PARMIGIANI, S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. **Physiol Behav**, v. 73, p. 411–20, 2001.
- PANDEY, S. C. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 456-460, 2003.
- PANDEY, S. C.; ZHANG, H.; ROY, A.; XU, T. Deficits in amygdaloid camp-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2762-2773, 2005.
- PARÉ, W. P. Stress ulcersusceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY) rats. **Physiol Behav**, v. 46, p. 993-998, 1989.
- PAULUS, M. P.; GEYER, M. A. Three independent factors characterize spontaneous rat motor activity. **Behav Brain Res**, v. 53, p. 11–20, 1993.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PEREZ, R. G.; WAYMIRE, J. C. ; LIN, E.; LIU, J. J.; GUO, F. ; ZIGMOND, M. J. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. **J Neurosci**, v. 22, p. 3090-3099, 2002.
- PETERSEN, K.; OLESEN, O. F.; MIKKELSEN, J. D. Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 91, p. 651-659, 1999.
- PICCINELLI, M.; WILKINSON, G. Gender Differences in depression. **B J Psychiatry**, v. 177, p. 486-492, 2000.
- PLAPPERT, C. F.; RODENBUCHER, A. M.; PILZ, P. K. Effects of sex and estrous cycle on modulation of the acoustic startle response in mice. **Physiol Behav**, v. 84, p. 585–94, 2005.
- PLOMIN, R.; DEFRIES, J. C.; MCCLEARN, G. E. Behavioral genetics a primer, 2nd edn. New York: W. H. Freeman and Company, 1990.
- POMPEI, P.; ANGELETTI, S.; POLIDORI, C.; CICCOCIOPO, R.; DE CARO, G.; MASSI, M. Regulation of preprotachykinin-A mRNA in genetic hypertensive and normotensive rats. **Mol Brain Res**, v. 47, p. 78–86, 1997.
- PORSOLT, R. D.; LEPICHNON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, v. 277, p. 730–2, 1977.
- POTENZA, M. N.; BRODKIN, E. S.; JOE, B.; LUO, X.; REMMERS, E. F.; WILDER, R. L.; NESTLER, E. J.; GELERNTER, J. Genomic Regions Controlling Corticosterone Levels in Rats. **Biol Psychiatry**, v. 55, p. 634–641, 2004.
- PRINTZ, M. P.; JIROUT, M.; JAWORSKI, R.; ALEMAYEHU, A.; KREN, V. HXB/BXH rat recombinant inbred strain platform: a newly enhanced tool for

- cardiovascular, behavioral, and developmental genetics and genomics. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 2510–2522, 2003.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- QUELLO, S. B.; BRADY, K. T.; SONNE, S. C. Mood disorders and substance use disorder: a complex comorbidity. **Sci Pract Perspect**, v. 3, p. 13-21, 2005.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, p. 493-498, 2008.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav Brain Res**, v. 85, p. 57-69, 1997.
- RAMOS, A.; CORREIA, E. C.; IZIDIO, G. S.; BRUSKE, G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behav Genet**, v. 33, p. 657-668, 2003.
- RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; DA SILVA SANTOS, J. E.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Lewis and SHR Rat Strains as a Genetic Model for the Study of Anxiety and Pain. **Behav Brain Res**, v. 129, p. 113-123, 2002.
- RAMOS, A.; MOISAN, M. P.; CHAOULOFF, F.; MORMEDE, C.; MORMEDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Mol Psychiatry**, v. 4, p. 453-462, 1999.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In *Neurobehavioral Genetics*, p. 291-306, 2006.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, p. 33-57, 1998.
- RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G. C.; WEHRMEISTER, T. D.; IZIDIO, G. S. Integrating the open Field, elevated plus-maze and light/dark box to

assess different types of emotionality behaviors in one single trial. **Behav Brain Res**, v. 193, p. 277-288, 2008.

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, 2004.

REGIER, D. A.; FARMER, M. E.; RAE, D. S.; LOCKE, B. Z.; KEITH, S. J.; JUDD, L. L.; GOODWIN, F. K. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) study. **JAMA**, v. 264, p. 2511-2518, 1990.

REW, D. A. The sequencing of the rat genome. **Eur J Surg Oncol**, v. 30, p. 905-906, 2004.

REX, A.; SONDERN, U.; VOIGT, J. P.; FRANCK, S.; FINK, H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, p. 107-111, 1996.

RIHMER, Z.; SZADOCZKY, E.; FÜREDI, J.; KISS, K.; PAPP, Z. Anxiety disorders comorbidity in bipolar I, bipolar II and unipolar major depression : results from a population-based study in Hungary. **J Affect Disord**, v. 67, p. 175-179, 2001.

ROBBINS, T. W. ADHD and Addiction. **Nature Med**, v. 8, p. 24-25, 2002.

RODD, Z. A.; BERTSCH, B. A.; STROTHER, W. N.; LE-NICULESCU, H.; BALARAMAN, Y.; HAYDEN, E.; JEROME, R. E.; LUMENG, L.; NURNBERGER, J. I.; EDENBERG, H. J.; MCBRIDE, W. J.; NICULESCU, A. B. Candidate genes, pathways and mechanisms for alcoholism: an expanded convergent functional genomics approach. **Pharmacogenomics J**, v. 7, p. 222-256, 2007.

- RODGERS, R. J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 289-304, 1997.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The effects of scopolamine and its quaternary analogue in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Pharmacol**, v. 6, p. 283-289, 1995.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. *Ethology and Psychopharmacology*, editado por Cooper, S. J. e Hendrie, C. A. John Wiley & Sons Ltd., p. 9-43, 1994.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; COBAIN, M. R.; DALY, P.; DORAN, P. J.; EELLS, J. R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. **Behav Pharmacol**, v. 3, p. 621-634, 1992.
- RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, p. 801-810, 1997.
- ROMEO, R. D.; MUELLER, A.; SISTI, H. M.; OGAWA, S.; MCEWEN, B. S.; BRAKE, W. G. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. **Horm Behav**, v. 43, p. 561-7, 2003.
- ROUILLON, F. Anxiety with depression: a treatment need. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, p. 587- 592, 1999.
- RUSSELL, V. A.; SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behav Brain Funct**, v. 1, p. 9, 2005.
- RYAN, S. M.; MAIER, S. F. The estrous cycle and estrogen modulate stress-induced analgesia. **Behav Neurosci**, v. 102, p. 371-80, 1988.

- SAGVOLDEN, T.; RUSSELL, V. A.; AASE, H.; JOHANSEN, E. B.; FARSHBAF, M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 1239-1247, 2005.
- SANDBERG, D.; DAVID, S.; STEWART, J. Effects of estradiol benzoate on the pattern of eating and ethanol consumption. **Physiol Behav**, v. 29, p. 61-65, 1982.
- SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D. J. The psycho biology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. **Pharmacol Ther**, v. 88, p. 197–212, 2000.
- SARIA, A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. **Eur J Pharmacol**, v. 375, p. 51-60, 1999.
- SCHUCKIT, M. A. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. **Am J Psychiatry**, v. 151, p. 184-189, 1994.
- SCHUCKIT, M. A.; HESSELBROCK, V. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? **Am J Psychiatry**, v. 151, p. 1723-1734, 1994.
- SELYE, H. The Stress of Life. McGraw-Hill book Company, New York, p. 513, 1976.
- SHALOM, A.; DARVASI, A. Experimental designs for QTL fine mapping in rodents. Methods. **Mol Biol**, v. 195, p. 199–223, 2002.
- SHERIDAN, J. F.; DOBBS, C.; JUNG, J.; CHU, X.; KONSTANTINOS, A.; PADGETT, D.; GLASER, R. Stress-induced neuroendocrine modulation of viral pathogenesis and immunity. **Ann N Y Acad Sci**. v. 840, p. 803-808, 1998.
- SILVA, G. J.; PEREIRA, A. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. **BMC Med Genet**, v. 8, p. 17, 2007.

- SINGER, J. B.; HILL, A. E.; NADEAU, J. H.; LANDER, E. S. Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. **Genetics**, v. 169, p. 855– 862, 2005.
- SMOLLER, J. W.; PAULUS, M. P.; FAGERNESS, J. A.; PURCELL, S.; YAMAKI, L. H.; HIRSHFELD-BECKER, D.; BIEDERMAN, J.; ROSENBAUM, J. F.; GELERNTER, J.; STEIN, M. B. Influence Of Rgs2 On Anxiety-Related Temperament, Personality, And Brain Function. **Arch Gen Psychiatry**, v. 65, p. 298-308, 2008.
- SPANAGEL, R.; MONTKOWSKI, A.; ALLINGHAM, K.; STÖHR, T.; SHOAIB, M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 369-373, 1995.
- STAHL, S. M. Peptides and psychiatry, part 3: substance P and serendipity: novel psychotropics are a possibility. **J Clin Psychiatry**, v. 60, p. 140-141, 1999.
- STERLING, P.; EYER, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fischer, J. Reason, J. Eds. Handbook of Life Stress, Cognition and Health. New York: John Wiley & Sons Inc., p. 629-649, 1988.
- STERNBERG, E. M.; GLOWA, J. R.; SMITH, M. A.; CALOGERO, A. E.; LISTWAK, S. J.; AKSENTIJEVICH, S.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L. E GOLD, P. W. Corticotropin Releasing Hormone related behavioural and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. **Brain Res**, v. 570, p. 54-60, 1992.
- STERNBERG, W. F.; MOGIL, J. S.; PILATI, M. L.; BOUN, C.; WONG, S.K.; LIEBESKIND, J. C. Neurochemical quality of nonopioid stress-induced analgesia is not altered by estrous phase in female mice. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 37, p. 141–3, 1994.
- STEWART, R. B.; GATTO, G. J.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of

- anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. **Alcohol**, v. 10, p. 1-10, 1993.
- STÖHR, T.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; FELDON, J. Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines. **Behav Brain Res**, v. 101, p. 163-172, 1999.
- SUZUKI, T.; GEORGE, F. R.; MEISCH, R. A. Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 245, p. 164-170, 1988b.
- SUZUKI, T.; OTANI, K.; KOIKE, Y.; MISAWA, M. Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. **Jpn J Pharmacol**, v. 47, p. 425-31, 1988a.
- SWAAB, D. F.; BAO, A.-M.; LUCASSEN, P. J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Rev**, v. 4, p. 141–194, 2005.
- SWENDSEN, J.; MERIKANGAS, K. R. The comorbidity of depression and substance use disorders. **Clin Psychol Rev**, 1998.
- SWITHERS, S. E.; MCCURLEY, M.; HAMILTON, E.; DOERFLINGER, A. Influence of ovarian hormones on development of ingestive responding to alterations in fatty acid oxidation in female rats. **Horm Behav**, v. 54, p. 471–477, 2008.
- TABAKOFF, B.; SABA, L.; KECHRIS, K.; HU, W.; BHAVE, S. V.; FINN, D. A.; GRAHAME, N. J.; HOFFMAN, P. L. The genomic determinants of alcohol preference in mice. **Mamm Genome**, v. 19, p. 352–365, 2008.
- TAKAHASHI, A.; NISHI, A.; ISHII, A.; SHIROISHI, T.; KOIDE, T. Systematic analysis of emotionality in consomic mouse strains established from C57BL/6J and wild-derived MSM/Ms. **Genes Brain Behav**, v. 7, p. 849–858, 2008.

- TAYLOR, A. N.; TIO, D. L.; BANDO, J. K.; ROMEO, H. E.; PROLO, P. Differential effects of alcohol consumption and withdrawal on circadian temperature and activity rhythms in Sprague–Dawley, Lewis, and Fischer male and female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, p. 438–47, 2006.
- TECOTT, L. H. The Genes and Brains of Mice and Men. **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 646-656, 2003.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonist and antagonist on plus-maze behaviors in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 311, p. 7-14, 1996.
- TERENINA-RIGLADIE, E.; JONES, B. C.; MORMÈDE, P. Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **Genes Brain Behav**, v. 2, p. 125-131, 2003a.
- TERENINA-RIGLADIE, E.; MOISAN, M.-P.; COLAS, A.; BEAUGÉ, F.; SHAH, K. V.; JONES, B. C.; MORMÈDE, P. Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. **Pharmacogenetics**, v. 13, p. 543-554, 2003b.
- The International Human Genome Mapping Consortium A physical map of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 934–941, 2001.
- The International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 934–941, 2001.
- The STAR Consortium SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. **Nature Genet**, v. 40, p. 560-566, 2008.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents, a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, p. 203-222, 1985.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, p. 463-469, 1993.

- TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated among inbred mouse strains. **Psychopharmacology**, v. 111, p. 323-331, 1993.
- TUOMINEN, K.; HILAKIVI, L. A.; PAIVARINTA, P.; KORPI, E. R. Behavior of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rat lines in tests of anxiety and aggression. **Alcohol**, v. 7, p. 349-353, 1990.
- TURRI, M. G.; DATTA, S. R.; DEFRIES, J.; HENDERSON, N. D.; FLINT, J. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. **Curr Biol**, v. 11, p. 725-734, 2001a.
- TURRI, M. G.; HENDERSON, N. D.; DEFRIES, J.; FLINT, J. Quantitative Trait Locus Mapping in Laboratory Mice Derived From a Replicated Selection Experiment for Open-Field Activity. **Genetics**, v. 158, p. 1217–1226, 2001b.
- UPHOUSE, L. ; HIEGEL, C.; SARKAR, J.; HURLBURT, J.; TEMPLETON, C.; GUPTARAK, J.; MASWOOD, N. Female gonadal hormones, mild restraint, and male preference. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, p. 758–762, 2008.
- VADASZ, C.; SAITO, MARIKO; GYETVAI, B. M.; OROS, M.; SZAKALL, I.; KOVACS, K. M.; PRASAD, V. V. T. S.; MORAHAN, G.; TOTH, R. Mapping of QTLs for Oral Alcohol Self-Administration in B6.C and B6.I Quasi-Congenic RQI Strains. **Neurochem Res**, v. 32, p. 1099–1112, 2007.
- VAN DER STAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Res Rev**, v. 52, p. 131-159, 2006.
- VAN DER STAAY, F. J.; STECKLER, T. The fallacy of behavioral phenotyping without standardization. **Genes Brain Behav**, v. 1, p. 9-13, 2002.
- VARTY, G. B.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; MORGAN, C. A.; PYLAK, U.; DUFFY, R. A.; LACHOWICZ, J. E.; CAREY, G. J.; COFFIN, V. L. The Gerbil Elevated Plus-maze II: Anxiolytic-like Effects of Selective Neurokinin NK1 Receptor Antagonists. **Neuropsychopharmacology**, v. .27, 2002.

- VENDRUSCOLO, L. F.; IZÍDIO, G. S.; TAKAHASHI, R. N. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder - the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Curr Drug Abuse Rev**, in print.
- VENDRUSCOLO, L. F.; TERENINA-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMEDE, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes Brain Behav**, v. 5, p. 441-450, 2006a.
- VENDRUSCOLO; L. F.; TAKAHASHI, R. N.; BRUSKE, G. R.; RAMOS, A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 170, p. 287-293, 2003.
- VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M. The Sequence of the Human Genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.
- VICINI, S.; ORTINSKI, P. Genetic manipulations of GABAA receptor in mice make inhibition exciting. **Pharmacol Ther**, v. 103, p. 109–120, 2004.
- VIGLINSKAYA, I. V.; OVERSTREET, D. H.; KASHEVSKAYA, O. P.; BADISHTOV, B. A.; KAMPOV-POLEVOY, A. B.; SEREDENIN, S. B.; HALIKAS, J. A. To drink or not to drink: tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rat strains. **Physiol Behav**, v. 57, p. 937-941, 1995.
- VISSCHER, P. M., R. THOMPSON, ET AL. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, v. 143, p. 1013-1020, 1996.
- VOIKAR, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; RAUVALA, H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. **Physiol Behav**, v. 72, p. 271–81, 2001.

- WAHLESTEDT, C. Rewards for persistence in substance P research. **Science**, v. 281, p. 1624-1625, 1998.
- WAHLSTEN, D.; METTEN, P.; PHILIPS, T. J.; BOEHM II, S. L.; BURKHART-KASCH, S.; DOROW, J.; DOERKSEN, S.; DOWNING, C.; FOGARTY, J.; RODD-HENRICKS, K.; HEN, R.; MCKINNON, C. S.; MERRILL, C. M.; NOLTE, C.; SCHALOMON, M.; SCHLUMBOHM, J. P.; SIBERT, J. R.; WENGER, C. D.; DUDEK, B. C.; CRABBE, J. C. Different Data from Different Labs: Lessons from Studies of Gene-Environment Interaction. **J Neurobiol**, v. 54, p. 283-311, 2003.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, p. 482-504, 1976.
- WATANABE, T. K.; BIHOREAU, M-T; MCCARTHY, L. C.; KIGUWA, S. L.; HISHIGAKI, H.; TSUJI, A. *et al.* A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. **Nature Genet**, v. 22, p. 27-36, 1999.
- WEHNER, J. M.; RADCLIFFE, R. A.; BOWERS, B. J. Quantitative genetics and mouse behavior. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 845–867, 2001.
- WEHNER, J. M.; RADCLIFFE, R. A.; ROSMANN, S. T.; CHRISTENSEN, S. C.; RASMUSSEN, D. L.; FULKER, D. W.; ET AL. Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. **Nature Genet**, v. 17, p. 331-334, 1997.
- WERSINGER, C.; PROU, D.; VERNIER, P.; SIDHU, A. Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. **Faseb J**, v. 17, p. 2151-3, 2003.
- WERSINGER, C.; SIDHU, A. Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. **Neurosci Lett**, v.340, p.189-92, 2003.

- Who International Consortium in Psychiatric Epidemiology Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, 2000.
- Who World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, Severity, and Unmet Need for Treatment of Mental Disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **JAMA**, v. 291, p. 2581, 2004.
- WILLIS-OWEN, S. A. G.; FLINT, J. The genetic basis of emotional behaviour in mice. **Eur J Hum Genet**, v. 14, p. 721–728, 2006.
- WILLNER, P. Validation criterion for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 10, p. 677–609, 1986.
- WITTCHEN, H. U.; PERKONIGG, A.; REED, V. Comorbidity of mental disorders and substance use disorders. **European Addiction Research**, v. 2, p. 36–47, 1996.
- WITTCHEN, H. U.; ZHAO, S.; KESSLER, R. C.; EATON, W. W. DSM-III-R generalized anxiety disorder in the national comorbidity survey. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, p. 355-364, 1994.
- WÜRBEL, H. Behavioral phenotyping enhanced beyond (environmental) standardization. **Genes Brain Behav**, v. 1, p. 3-8, 2002.
- YALCIN, B.; WILLIS-OWEN, S. A.; FULLERTON, J.; MEESAQ, A.; DEACON, R. M.; RAWLINS, J. N.; et al. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that Rgs2 modulates anxiety in mice. **Nat Genet**, v. 36, p. 1197–1202, 2004.
- YEREVANIAN, B.; KOEK, R. J.; RAMDEV, S. Anxiety disorders comorbidity in mood disorder subgroups: data from a mood disorders clinic. **J Affect Disord**, v. 67, p. 167-173, 2001.

- ZUBENKO, G. S.; HUGHES III, H. B.; STIFFLER, J. S.; ZUBENKO, W. N.; KAPLAN, B. B. D2S2944 identifies a likely susceptibility locus for recurrent, early-onset, major depression in women. **Mol Psychiatry**, v. 7, p. 460–467, 2002.
- ZUBENKO, G. S.; MAHER, B. S.; HUGHES, H. B.; ZUBENKO, W. N.; SCOTT STIFFLER, J.; MARAZITA, M. L. Genome-wide linkage survey for genetic loci that affect the risk of suicide attempts in families with recurrent, early-onset, major depression. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 129B, p. 47-54, 2004.
- ZULOAGA, D. G.; MORRIS, J. A.; JORDAN, C. L.; BREEDLOVE, S. M. Mice with the testicular feminization mutation demonstrate a role for androgen receptors in the regulation of anxiety-related behaviors and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Horm Behav**, v. 54, p. 758–766, 2008.

## 8-ANEXOS

### 8.1 *Campo Aberto (CA)*

O teste do campo aberto (CA) é provavelmente o teste de emocionalidade mais popular no mundo (Ramos, 2008). Ele foi desenvolvido em 1934 por Calvin Hall e desde então, diversos trabalhos têm utilizado este aparato para avaliar os efeitos de manipulações ambientais, de drogas e de fatores genéticos sobre a emocionalidade de roedores. O aparato consiste de uma arena cercada por paredes, onde o animal é colocado e pode explorá-lo livremente por certa quantidade de tempo. Na literatura disponível sobre este teste, encontramos freqüentemente diferenças na forma, cor, iluminação e métodos de avaliação (Walsh e Cummins, 1976; Sternberg *et al.*, 1992; Trullas e Skolnick, 1993; Castanon e Mormède, 1994; Ossenkopp *et al.*, 1994; Ramos, 2008). Algumas destas modificações na situação de teste podem prejudicar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e até mesmo mascarar efeitos genéticos (Crabbe *et al.*, 1999; Chesler *et al.*, 2002; Wahlsten *et al.*, 2003). Um grande número de variáveis comportamentais pode ser medido no teste do CA como: locomoção, defecação, congelamento, alisamento, exploração de pé, vocalização, etc.: (Archer, 1973; Walsh e Cummins, 1976). Dentre estas medidas, as duas mais comumente aceitas como medidas de emocionalidade animal são: a locomoção e a defecação em resposta a um ambiente inédito (Gray, 1979; Lister, 1990; Ossenkopp *et al.*, 1994). Existem, ainda, outras medidas no teste do CA, que nem sempre são consideradas em estudos de emocionalidade (tempo e locomoção na área central e periférica), as quais são obtidas a partir da distinção deste aparato em área central e área periférica

(Ramos e Mormède, 1998). A área central, como o próprio nome diz, é a área que se localiza no centro do aparato, desprovida de paredes, sendo a área periférica aquela adjacente às paredes do aparato e que permite a realização de tigmotaxia por parte do animal. Considera-se, classicamente, que a área central deste aparato seja a mais aversiva, pois drogas ansiolíticas tendem a aumentar a locomoção e o tempo de permanência nesta área, enquanto drogas ansiogênicas apresentam o resultado contrário (Gentsch *et al.*, 1987). Provavelmente, isto se deva a um conjunto de fatores como a neofobia e a esquiva de regiões abertas, onde os roedores não possam realizar tigmotaxia (movimento que o rato faz com as vibrissas no intuito de receber informações sensoriais do meio) (Treit *et al.*, 1993).

#### *8.2 Caixa Branca/Preta (CBP)*

Outro teste comportamental utilizado no presente estudo foi a caixa branca/preta (CBP) (uma pequena caixa com dois compartimentos conectados: um branco e fortemente iluminado e outro preto, somente com iluminação vermelha), onde o rato é colocado, no centro do compartimento branco, podendo então atravessar em direção ao compartimento preto ou permanecer no branco. Considera-se, classicamente, que o nível de exploração do compartimento branco e o número de transições entre os compartimentos dependem do nível de “ansiedade” do animal (Crawley, 1981). Segundo Crawley (1981), este teste possui algumas vantagens, como a rapidez e a simplicidade do método, a reprodutibilidade dos resultados e o pequeno tamanho do aparato. Ainda, a alta eficiência e a especificidade psicofarmacológica para medir os efeitos comportamentais de agentes

ansiolíticos (benzodiazepinas, álcool e nicotina) e ansiogênicos (FG7142), fazem deste teste um bom modelo para o estudo da ansiedade (Crawley, 1981; Costall *et al.*, 1989).

### *8.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)*

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados e foi desenvolvido baseado na observação de que os ratos evitam lugares abertos e elevados e que este comportamento de esquila é gerado pelo medo (Montgomery, 1955). Ele consiste em um labirinto em forma de cruz com quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados (com paredes). De maneira simples, durante o teste o rato é colocado em uma plataforma central (região de intersecção entre os quatro braços), podendo ali permanecer ou dirigir-se a um dos braços (aberto ou fechado). Em um extenso estudo, Pellow *et al.* (1985) validaram este teste através do uso de abordagens farmacológicas, comportamentais e fisiológicas. Quando expostos ao LCE pela primeira vez, um rato ou camundongo *naïve* apresentará sinais de conflito, esquila e fuga, sendo que o animal considerado como mais “ansioso” irá menos vezes e permanecerá por menos tempo nos braços abertos e desprotegidos do aparato. Esta esquila aos braços abertos (região aversiva do aparato) é diminuída através de drogas ansiolíticas clássicas e aumentada por drogas ansiogênicas (Pellow *et al.*, 1985; Lee e Rodgers, 1987; Lee e Rodgers, 1990; Rodgers *et al.*, 1992; Handley e McBlane, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Rodgers e Cole, 1995).

### *8.4 Teste do nado forçado (TNF)*

O TNF é um dos testes mais utilizados na avaliação de drogas antidepressivas. Ele consiste em colocar o rato em um cilindro de vidro (40cm de altura; 18 cm de diâmetro) contendo água limpa mantida entre 24 °C e 26 °C (Porsolt *et al.*, 1977; Borsini e Meli, 1988). Como ratos são bons nadadores o animal é exposto a um pré-teste por 15 minutos, e 24h depois, exposto novamente ao aparato durante 5 minutos, nas condições descritas acima. Neste teste comportamental, registram-se medidas como: escalada, defecação e mergulho. Porém, o tempo de imobilidade talvez seja a medida mais representativa deste teste comportamental. Um alto tempo de imobilidade neste teste é considerado com um índice comportamental relacionado à depressão, sendo que o animal é considerado imóvel quando somente faz movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. Sabe-se que drogas antidepressivas diminuem o tempo de imobilidade dos ratos neste teste comportamental (Borsini e Meli, 1988; Cryan *et al.*, 2005).

#### *8.5 Teste de consumo de etanol*

Existem na literatura diversos protocolos para se avaliar o consumo de etanol em animais experimentais. As principais diferenças entre eles são: a presença de períodos de adaptação, de substâncias controles, de consumo de etanol forçado, de concentrações de etanol variadas, períodos de exposição variados ao etanol e o tipo das gaiolas utilizadas para a realização dos experimentos. Assim, nosso protocolo foi adaptado de acordo com o descrito por Terenina-Rigaldie *et al.* (2003a). Ou seja, os ratos passam por uma fase de habituação em gaiolas individuais, seguido de um período de consumo de etanol forçado e um período de livre escolha entre água e etanol em

concentrações crescentes. Baseado no consumo em g/kg/dia de etanol ou na preferência por esta solução, podemos inferir sobre fatores ligados a predisposição ao consumo de etanol em ratos. Em roedores, as fêmeas consomem maiores quantidades de etanol do que machos (Almeida *et al.*, 1998; Cailhol e Mormède, 2001; Cailhol e Mormède, 2002; Da Silva *et al.*, 2004, Izídio e Ramos, 2007) com sugerida participação de hormônios sexuais, como por exemplo, o estradiol (Sandberg *et al.*, 1982; Marinelli *et al.*, 2003).

### *8.6 Ciclo estral*

Recentemente, alguns pesquisadores têm atentado para a importância do uso de fêmeas em baterias de testes comportamentais (Crawley e Paylor 1997; Voikar *et al.* 2001), mas, mesmo assim, esta é ainda uma prática rara. Como já comentado anteriormente, um grande número de transtornos neuropsiquiátricos ou alguns de seus sintomas específicos apresentam diferenças inter-sexuais. Por exemplo, transtornos relacionados ao estresse, tais como certos tipos de ansiedade ou depressão, têm sido observados mais frequentemente em mulheres do que em homens (Frackiewicz *et al.* 2000; Sandford *et al.* 2000).

Uma das principais razões da exclusão das fêmeas dos testes comportamentais com animais experimentais é a flutuação hormonal que ocorre durante o seu ciclo estral. Basicamente, os ratos pertencem a um grupo de animais com ciclo estral curto (4-5 dias), onde ocorrem mudanças fisiológicas no ovário, útero e vagina dependentes de cada uma das 4 fases onde as fêmeas podem se encontrar (Hebel e Stromberg, 1986). Estas fases são nomeadas proestro (~12h de duração), estro (~12h), metaestro (~21h) e

diestro (~57h) (Hebel e Stromberg, 1986). Uma técnica muito utilizada para se determinar a fase do ciclo é a coleta de secreção vaginal para observação em microscópio óptico. Resumidamente, nesta técnica três tipos de células podem ser reconhecidas. As redondas e nucleadas são células epiteliais, as irregulares e sem núcleo são as corneificadas e as pequenas e redondas são os leucócitos. Assim, as fases apresentam algumas características típicas que permitem a identificação: o diestro tem a predominância de leucócitos, acompanhado de células epiteliais nucleadas e podendo conter células corneificadas; o proestro tem predominância de células nucleadas, podendo aparecer células corneificadas; o estro contém exclusivamente células corneificadas; e o metaestro contém uma grande quantidade de leucócitos em blocos ou dispersos, em menor quantidade do que no diestro, juntamente com células corneificadas e nucleadas (Marcondes *et al.*, 2002).

Alguns estudos vêm sugerindo que a flutuação hormonal causada pelo ciclo estral pode alterar o comportamento das fêmeas. Por exemplo, Mora *et al.* (1996) sugeriram que a exploração do LCE difere de acordo com a fase do ciclo estral de ratas. Resultados similares também já foram encontrados no teste do CA (Meziane *et al.*, 2007). Mas a maioria destes estudos ainda foca em fases pré-selecionadas do ciclo ao invés da avaliação de todas as fases. Por exemplo, alguns trabalhos utilizaram fêmeas no estro e proestro (Gray e Cooney 1982; Romeo *et al.*, 2003; Ryan e Maier 1988; Sternberg *et al.*, 1994) ou estro, proestro e metaestro (Mogil *et al.*, 2000), em detrimento do uso de fêmeas em todas as quatro fases (Palanza *et al.*, 2001; Plappert *et al.*, 2005). A explicação metodológica para esta preferência está baseada no grande número amostral necessário para a comparação correta de todas as fases do ciclo

estral.

Sabe-se, também, que além de aspectos comportamentais, muitas funções neurais são influenciadas por mudanças hormonais em ratas. Por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que o estradiol e a progesterona exercem efeitos ansiolíticos (Díaz-Véliz *et al.*, 1997; Frye e Walf, 2002; Gómez *et al.*, 2002). Assim, as diferenças comportamentais dependentes das fases do ciclo estral das ratas constituem uma variável que deve ser levada em conta em estudos envolvendo fêmeas. Isto poderá nos levar a uma melhor compreensão dos mecanismos do comportamento animal assim como a uma identificação de genes que afetam o comportamento e os transtornos psiquiátricos e são dependentes de fatores sexuais.